

**DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE
UNTERSUCHUNGEN BEIM KINDLICHEN
MALABSORPTIONSSYNDROM**

Michael Lentze

1975

Aus der Kinderklinik der Universität im Dr. von Haunerschen
Kinderspital

Direktor: Prof.Dr. K. Betke

DÜNN SCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN BEIM KINDLICHEN
MALABSORPTIONSSYNDROM

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von
Michael L e n t z e
aus Oberammergau
München 1975

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. J. Schaub
2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. M. Forell
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 11. 3. 1975



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Einleitung	S. 1
Methodik	S. 5
pH-Bestimmung im Stuhl	S. 5
Milchsäurebestimmung im Stuhl	S. 5
Dünnschichtchromatographie von	
Zuckern im Stuhl	S. 6
Gesamtzuckerbestimmung im Stuhl	S. 7
Disaccharidasenbestimmung mit	
Dünnschichtchromatographie	S. 8
Dipeptidasenbestimmung mit	
Dünnschichtchromatographie	S. 10
Disaccharidasenbestimmung durch	
Messung von Glucose	S. 11
Dipeptidasenbestimmung durch	
Messung von freien Aminosäuren	S. 12
Ergebnisse	S. 13
Diskussion	S. 34
Zusammenfassung	S. 49
Literaturverzeichnis	S. 52

E I N L E I T U N G

Das Interesse der Kliniker an der Differenzierung kindlicher Malabsorptionssyndrome ist in den letzten Jahren stark gestiegen seit Crane(27) als Ort für die Hydrolyse von Disacchariden die Bürstensaummembran der Mikrovilli der Dünndarmmukosa erkannte und bei der intestinalen Disaccharidasendefizienz von einer brush border membrane disease sprach.

Die Störung der Absorption von Zuckern und Eiweißen ist häufig bei der Coeliakie(95) und bei anderen Erkrankungen des Intestinaltraktes, so bei der Kuhmilchintoleranz(77) und bei Kindern mit akuten Durchfällen.

Als angeborene Störungen tritt eine Zuckermalabsorption bei den verschiedenen Formen der Disaccharidasendefizienz, so des Lactase-Mangels(109) und des Isomaltase-Saccharase-Mangels auf(12). Weiterhin wurde die Diagnose der Zuckermalabsorptions-syndrome bedeutsam, seit Lindqvist und Meeuwisse(74) und Laplane und Mitarb.(64) über eine Störung des aktiven Transportes für Galactose und Glucose bei Kindern mit chronischen Durchfällen berichteten. Diese Störung bezeichneten sie dann als Glucose-Galactose-Malabsorption.

Die Disaccharidasendefizienz ist eine auf der ganzen Welt weit verbreitete Anomalie, die einzelne Bevölkerungsgruppen mehr oder minder befällt. So leiden etwa 70% der schwarzen Amerikaner an einem Lactasemangel(18). Nach Untersuchungen von Rotthauwe und Mitarb.(90) wurde in Deutschland eine Häufigkeit der Lactasedefizienz von 16% der Erwachsenen gefunden.

Das Konzept eines Enzymmangels in der Bürstensaumregion, wie

es für die angeborene und erworbene Disaccharidasendefizienz gilt(66) (77) (95) (110), wurde auch auf den letzten Schritt der Eiweißverdauung übertragen, in der die Dipeptidhydrolasen die wichtigste Rolle spielen (10) (20) (33) (39) (52).

Dieser letzte Schritt der Proteinverdauung wurde darüberhinaus noch interessant seit Frazer(45) einen Mangel von Dipeptidhydrolasen als Ursache für die Coeliakie annahm.

Um eine Zuckermalabsorption zu diagnostizieren- sei sie hervorgerufen durch eine angeborene bzw. erworbene Disaccharidasendefizienz oder durch eine Glucose-Galactose-Malabsorption- lag es nahe, die mehr oder minder durchfälligen Entleerungen auf eine pathologische Zusammensetzung zu untersuchen.

Verschiedene Autoren hielten die Bestimmung von Gesamtzucker-gehalt, Milchsäurekonzentration und pH im Stuhl für eine gute Möglichkeit zur Erkennung des Grades und des Typs der Malabsorption (1) (62) (74) (98) (109) (111). Bei diesen Untersuchungen wurden verschiedene Methoden angewandt und widersprüchliche Resultate erzielt. Nur wenige Berichte über die Ausscheidung von Zuckern und Milchsäure sowie über den pH-Wert im Stuhl von normalen Neugeborenen, Frühgeborenen, Säuglingen und Kleinkindern sind bekannt geworden(17) (34) (43) (48) (103).

Da die Verdauung und Spaltung der Kohlenhydrate, die mit der Nahrung aufgenommen werden, verschiedenen Mechanismen sowohl im Dünndarm als auch im Dickdarm unterliegen, konnte die Herkunft der im Stuhl ausgeschiedenen Zucker bisher nicht sicher geklärt werden. Ebenso wurde der Mechanismus, der zu einer Proliferation von Bakterien im Dünndarm von Kinder mit Diarrhoe und gleichzeitig hohem Kohlenhydratgehalt führt, nicht ausreichend erhellt.

Methodisch war man den anstehenden Fragen meist folgendermaßen nachgegangen. Anderson und Mitarb.(3) bestimmten als erste die Aktivitäten der Disaccharidasen mit Hilfe der Papierchromatographie. Später wurden Methoden entwickelt, die die aus der Hydrolyse freigesetzte Glucose bestimmten: so die Glucose-Oxidase Methode nach Auricchio und Mitarb.(15) sowie Burgess und Mitarb.(22), und die Hexokinase-Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Methode nach Sols und De la Fuente (99).

Für die Bestimmung der Dipeptidhydrolasen in der Mukosa wurden zunächst Methoden entwickelt, die auf der Ninhydrinreaktion basieren, so wie sie Messer und Mitarb.(83), Matheson und Tatrie(78) und Lenard und Mitarb.(67) beschrieben. Anschließend folgten Josefson und Lindberg(57) mit der spectrophotometrischen Methode, bei der die Abnahme der Absorption von hydrolysierten Peptiden bei 220 nm gemessen wird.

Dazu kamen die Stärkegelelektrophorese nach Dolly und Fotrell(37) und enzymatische Methoden, die auf der Reaktion von freien Aminosäuren mit Aminosäure-Oxidase aus Crotalus adamanteus Schlangengift basieren. Hierbei werden die freien Aminosäuren oxydativ desaminiert und der freigewordene Sauerstoff mit Hilfe der Peroxidase und einer damit gekoppelten Farbstoffreaktion gemessen. Diese Methoden wurden in verschiedenen Modifikationen von Heizer und Laster(53), Lewis und Harris(68), Auricchio und Mitarb.(11), Donlon und Fotrell(38) und Sinha und Mitarb.(96) angegeben.

Da die Unterlagen über die Verhältnisse bei normalen Frühgeborenen Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern sowie bei Kindern mit Durchfällen spärlich und noch dazu widersprüchlich sind(9)(12)

(25)(76)(109), wurden in der vorliegenden Arbeit der Gesamtzuckergehalt, die Milchsäurekonzentration und das pH im Stuhl von 160 Kindern untersucht, die im Alter von 1 Tag bis 2 Jahre waren. Außerdem wurden die Zuckerspektren von 142 normalen Frühgeborenen, Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern sowie 21 Kindern mit Durchfällen mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Weiterhin wurde die Dünndarmschleimhaut von 90 Kindern untersucht, wobei zwei neue semiquantitative Methoden zur Bestimmung der Disaccharidasen und Dipeptidasen ausgearbeitet wurden. Diese Methoden basieren auf der dünnschichtchromatographischen Auftrennung von Substrat-Homogenisatgemischen nach Inkubation bei 37°C. Die herkömmlichen Methoden sind für die Bestimmung der Disaccharidasen und Dipeptidasen sehr aufwendig, wobei bei der Bestimmung der letzteren noch die Tatsache hinzukommt, daß die quantitative Messung für manche Dipeptide nicht möglich ist.

M E T H O D I K

1. M e t h o d e n für die Bestimmung von Gesamtzuckergehalt, Milchsäurekonzentration und pH, sowie der verschiedenen Zuckerspektren im Stuhl von Frühgeborenen, Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern.

Frische Stuhlproben wurden in Plastikschaalen gesammelt und bis zur Durchführung der Analysen bei -20°C tiefgefroren.

a. pH-Messung des Stuhls: der pH-Wert des Stuhls wurde mit der Methode nach Auricchio und Mitarb. (12) mit Spezial-pH-Papier (Merck) pH 3.8 - 5.4 und 5.4 - 7.0 gemessen. Diese Methode ergibt im Vergleich mit der Messung mittels Glaselektrode gute Ergebnisse (69). Ebenso besteht kein Unterschied zwischen den pH-Werten von frischem und tiefgefrorenem Stuhl (98). Schwierig ist die pH-Bestimmung von Mekonium, da dessen grüne Farbe Anlaß zu Fehlwerten geben kann.

b. Milchsäurebestimmung im Stuhl: die Milchsäure im Stuhl wurde nach der Methode von Weijers und Van de Kamer (109) wie folgt gemessen: vom tiefgefrorenen Stuhl wurden 0.5 oder 1.0 g abgewogen. Dazu kamen 150 mg oder 300 mg $\text{Ca}(\text{OH})_2$ und 0.15 ml bzw 3.0 ml FeCl_3 -Lösung (10 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ in 100 ml bidest. Wasser, dazu 2 Tropfen konzentrierte HCl). Anschließend wurden 4.2. bzw 8.4 ml bidest. Wasser einpipettiert, so daß eine 1 : 10 verdünnte Stuhlsuspension entstand. Das Gemisch wurde gut geschüttelt und 10 Minuten stehen gelassen. Danach wurde das Gemisch durch 3 Filter (Schleicher und Schuell Nr. 595, $\varnothing$ 9 cm) filtriert. Die höheren Fettsäuren bleiben dabei als Ca-Seifen zurück, während die niedrigen Fettsäuren quantitativ in dem Filtrat gefunden werden.

L-Lactat wurde dann aus dem Filtrat mit der Lactatdehydrogenase-

methode wie bei Auricchio und Mitarb. (12) angegeben, gemessen.

c. Dünnschichtchromatographische Identifikation von Zuckern im Stuhl.

Der Wassergehalt des Stuhls bei normalen Kindern und solchen mit Durchfällen ist sehr unterschiedlich. Die Verwendung von Frischstuhl zur Chromatographie liefert keine vergleichbaren Werte. Deswegen wurde der tiefgefrorene Stuhl lyophilisiert und anschließend 1 : 10 mit Wasser verdünnt. Diese Stuhlsuspension entspricht etwa einem normalen Frischstuhl, der einen durchschnittlichen Wassergehalt von 85% (4) besitzt.

Die Stuhlsuspension wurde 15 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand filtriert (Schleicher und Schuell Nr. 595).

Vom Filtrat wurden 5 - 10 μ l auf Kieselgelfertigplatten 10 x 20 cm (Kieselgel F 254 Fertigplatten 20 x 20, Schichtdicke 0.25 mm, Merck, Darmstadt) 1.5 cm vom Rand mittels eines Applikators (Merck) in einer Breite von 2 cm aufgetragen (61). Aufsteigende eindimensionale Dünnschichtchromatographie wurde mit dem Fließmittel 0.016 M Borsäure in Isopropanol/ n-Butanol/ Wasser (50:30:20) in einem Lauf 8 cm vom Startpunkt bis zur Lösungsmittelfront durchgeführt. Nach Trocknung der Platten wurde ein zweiter Lauf im gleichen Fließmittel in die gleiche Richtung durchgeführt. Ein Lauf dauerte etwa 1 1/2 Stunden.

Identifikation der einzelnen Zucker: die nach dem zweiten Lauf getrockneten Platten wurden mit Naphthoresorcinlösung (200 mg Naphthoresorcin (Merck) werden in 100 ml Äthanol gelöst) gefärbt. Dabei werden vor dem Versprühen der Naphthoresorcinlösung in 26 ml der Lösung 4 ml konzentrierte H_2SO_4 pipettiert. Die Haltbarkeit dieser Lösung beträgt 2 Stunden. Die besprühten Platten werden 5

Minuten bei 90°C entwickelt. Zur Identifikation der einzelnen Zucker wurden Standardlösungen der verschiedenen Mono- und Disaccharide in einer Konzentration von 100 mg in 100 ml Isopropanol/ Wasser (Mischungsverhältnis 1 : 1) verwendet.

Die einzelnen Standardlösungen enthielten:

Standard 1: D(+) Xylose, D(+)Glucose,, D(+)Galactose,D(-)Fructose

Standard 2: Saccharose(2- α -D-Glucopyranosido-D-fructofuranosid),
Maltose (4- α -D-Glucopyranosido-D-Glucose),
Lactose(4- β -D-Galactopyranosido-D-glucose),
Palatinose(6-O- α -D-Glucopyranosido-D-fructofuranosid)
(107)

Standard 3: L(+)Rhamnose, L(+)Arabinose, D(-)Ribose,Isomaltose
(6-O- α -D-Glucopyranosido-D-glucose)

Standard 4: D(+)Mannose, L(-) Fucose.

Palatinose war ein Geschenk von Frau Dr.Leonhäuser, Boehringer & Soehne, Tutzing, alle anderen Zucker Merck, Darmstadt.

Die Konzentrationen der im Stuhl vorhandenen Zucker können gegenüber den bekannten Konzentrationen in den Standardlösungen geschätzt werden.

Zur Vermeidung des "Randphänomens" wurden die Chromatographiekammern (Desaga, Heidelberg) mit fließmittelgetränktem fettfreien Papier ausgekleidet(100). Eine Tabelle mit der Anfärbbarkeit und den Rf-Werten der verschiedenen Zucker findet sich bei Lato und Mitarb.(65). Die Nachweisgrenze bei dieser Methode liegt bei 0.25 bis 0.5 μ g Zucker pro Probe (5.0 - 10 μ l).

d. Gesamtzuckerbestimmung im Stuhl:

Der Gesamtzuckergehalt wurde mit der Anthron-Methode nach Roe(88) bestimmt. Mit dieser Methode werden alle Zucker, auch Oligosaccha-

ride und Polysaccharide gemessen. Diese Tatsache ist bedeutungsvoll für die Gesamtzuckerbestimmung im Stuhl, da sowohl die Polysaccharide aus der Nahrung als auch die der Hüllen der Bakterien gemessen werden. Da ein Drittel des Stuhltrockengewichtes aus Bakterien besteht (89) und der größte Teil davon tot ist, ergibt die Bestimmung der Gesamtzucker im nichtentkeimten Stuhl falsche Werte. Dies ließ sich folgendermaßen zeigen: jeweils 5 ml einer oben beschriebenen Stuhlsuspension wurden a.) 2 Stunden bei 6000 U/min zentrifugiert, b.) 3 Stunden bei 34000 U/min ultrazentrifugiert und c.) durch ein bakteriendichtes Filter Milipore HAWP 02500 keimfrei filtriert. Danach wurde in den Überständen von a.) und b.) sowie im Filtrat von c.) der Gesamtzuckergehalt bestimmt. In der unter b.) angegebenen ultrazentrifugierten Probe war nur 51% der Menge der unter a.) angegebenen Probe. In der keimfrei filtrierten Probe war nur 20% der Zuckermenge gegenüber der in a.) angegebenen Probe. Alle Proben wurden daher keimfrei filtriert und dann der Gesamtzuckergehalt gemessen.

2. D ü n n s c h i c h t c h r o m a t o g r a p h i s c h e Methoden zur Bestimmung der Disaccharidasen und Dipeptidhydrolasen aus Dünndarmbiopsien.

Für die Analyse wurden Dünndarmbiopsien von 90 Kindern im Alter von 1 Monat bis 16 Jahren gewonnen, die mit der klinischen Diagnose eines Malabsorptionssyndromes in der Kinderklinik der Universität München zur stationären Aufnahme kamen.

Für die Durchführung der Biopsien und die Überlassung der Schleimhautproben danke ich Herrn Dr.K.Harms von der Universitätskinderklinik in München.

Die Saugbiopsie wurde mit der für Kinder modifizierten(80) Kapsel von Crosby und Kugler(28) durchgeführt. Weder während noch nach den Saugbiopsien wurden Komplikationen beobachtet. Die Mukosaproben wurden in der Nähe des Treitzschen Ligamentes entnommen(90), die Lage der Kapsel wurde fluoroskopisch kontrolliert(94). Ein Teil der entnommenen Probe wurde für stereomikroskopische und histologische Untersuchungen reserviert, der andere Teil wurde bis zur Durchführung der Analyse bei -20°C tiefgefroren. Die Aktivitäten der Disaccharidasen(106) und Dipeptidhydrolasen (33) sind unter diesen Bedingungen für Monate konstant.

Das tiefgefrorene Gewebe (zwischen 1 und 16mg) wurde homogenisiert und folgendermaßen mit bidest. Wasser verdünnt: 1 : 25 für die Bestimmung der Disaccharidasen mittels Dünnschichtchromatographie, 1 : 75 für die Bestimmung der Dipeptidhydrolasen mittels Dünnschichtchromatographie und 1 : 300 für die quantitative Messung der Dipeptidhydrolasen mit der Aminosäure-Oxidase-Methode.

Die Homogenisation wurde mit einem Ultraschallhomogenisator (Branson Sonifier B 10, Mikrotip) 10 sec bei 4°C durchgeführt.

a. Bestimmung der Disaccharidasen mit der Dünnschichtchromatographie.

10 μl Homogenisat wurden mit 10 μl einer Substrat-Puffer-Lösung (0.056 M Disaccharid in 0.1 M Natriummaleatpuffer, pH 6.0) gemischt (29)(31) und anschließend bei 37°C inkubiert.

Bei 0, 30, 60 und 90 Minuten wurden 2 μl entnommen und ohne Enteiweißung auf Kieselgelplatten 10 x 20 cm (Kieselgel F 254 Fertigplatten 20 x 20 cm, Merck) punktförmig aufgetragen.

Aufsteigende Dünnschichtchromatographie wurde mit der gleichen Methode durchgeführt wie für die Bestimmung der Zucker im Stuhl.

Folgende Substrate wurden für die Enzymreaktion verwendet: Lactose für Lactase 1 und 2, Maltose für Maltase 1 und 2, Saccharose für Maltase 3 und 4 (Saccharase genannt) und Palatinose für Maltase 5. Für die Einteilung der Disaccharidasen wurde die Nomenklatur nach Auricchio und Semenza benutzt(16)(93). Im menschlichen Dünndarm werden Isomaltose und Palatinose durch dasselbe Enzym, nämlich durch die Maltase 5, hydrolysiert (32). Deshalb wurde Palatinose als Substrat für die Bestimmung der Isomaltase verwendet, da sich Isomaltose nicht mit Naphthoresorcin anfärben läßt.

b.Bestimmung der Dipeptidhydrolasen mit der Dünnschichtchromatographie:

Folgende Substrate wurden für die Messung der Dipeptidhydrolasen mittels Dünnschichtchromatographie benutzt:

L-Glutamyl-L-Valin, L-Alanyl-L-Glutaminsäure, L-Alanyl-L-Prolin, Glycyl-L-Valin, L-Leucyl-Glycin, L-Valyl-L-Prolin, L-Tyrosyl-L-Tyrosin, L-Alanyl-L-Leucin (Miles Laboratory, Elkhart, Ind. USA), L-Valyl-L-Glutaminsäure, Glycyl-L-Leucin (Fluka, Buchs, Schweiz), Glycyl-L-Glutamin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA).

5 oder 10 μ l des Homogenisates (1: 75) wurden mit derselben Menge einer Substrat-Puffer-Lösung (0.4 μ mol Dipeptid in 0.6 μ mol Phosphat/Citrat/Borat-Puffer, pH 8.5) (11)(102) gemischt und anschließend bei 37°C inkubiert.

Auf Grund des hygroskopischen Charakters einiger Dipeptide, z.B. Val-Glu und Gly-GluNH₂ wurden die Konzentrationen aller Substrate in den Pufferlösungen nach einer sauren Hydrolase unter Stickstoff mit einer Standard-Aminosäure-Analyzer-Methode gemessen. Der mittlere Fehler betrug $\pm$ 11% der eingewogenen Menge.

Bei 0, 15, 30, 60 und 90 Minuten wurden 1 μ l mit Mikrokapillaren (Drummond Scientific Co., Broomall, Pa. USA) entnommen und ohne Enteiweißung auf Cellulose Fertigplatten 10 x 10 cm ohne Fluoreszenz-indikator (Merck) aufgetragen.

Die korrespondierenden Aminosäuren wurden in einer Konzentration von 10 μ mol pro ml ebenfalls als Marker-Substanzen aufgetragen.

In einem Lauf bis 7 cm vom Startpunkt wurde die aufsteigende Dünnschichtchromatographie mit dem Fließmittel Pyridin/Dioxan/25% Ammoniak/Wasser (35:35:15:15) (63) für alle Substrate außer Gly-GluNH₂ durchgeführt. Für dieses Substrat wurde das Fließmittel Phenol-Ameisensäure (15%) benutzt(27).

Nach Trocknung der Platten wurde ein zweiter Lauf in die gleiche Richtung mit den gleichen Fließmitteln durchgeführt.

Die verschiedenen Dipeptide und die durch Hydrolyse entstandenen Aminosäuren wurden nach Ansprühen der Platten mit Ninhydrinlösung (0.3 g Ninhydrin in 100 ml Methanol)(21) und anschließender Entwicklung 5 Minuten bei 80°C an Hand der mitaufgetragenen Marker-Substanzen lokalisiert und identifiziert.

c. Bestimmung der Disaccharidasen durch die Messung von Glucose

Um die Aktivitäten der Disaccharidasen quantitativ zu bestimmen, wurde die durch die Hydrolyse freigesetzte Glucose während der Inkubation gemessen.

Für die Bestimmung wurde das 1 : 25 verdünnte Homogenisat folgendermaßen weiter verdünnt:

Für die Messung der Lactase 1 : 1

(Lactase 1 und 2)

für die Messung der Maltase 1 : 5

(Maltase 1 und 2)

für die Messung der Saccharase 1 : 1
(Maltase 3 und 4)

für die Messung der Isomaltase 1 : 2
(Maltase 5)

Im Gegensatz zur Dünnschichtchromatographie wurde für die quantitative Messung der Isomaltase das Disaccharid Isomaltose anstatt Palatinose benutzt.

20 μ l des verdünnten Homogenisates wurden mit 20 μ l derselben Substrat-Puffer-Lösung wie für die Bestimmung der Disaccharidasen mittels Dünnschichtchromatographie gemischt und geschüttelt. Anschließend wurde das Gemisch 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen der Probe in einem siedenden Wasserbad für 2 Minuten gestoppt.

Eine zweite Probe, die das Gemisch Substrat-Puffer-Lösung enthielt, wurde ohne Inkubation im Wasserbad erhitzt und diente als Leerwert.

Die durch die Hydrolyse entstandene Glucose wurde mit der bei Sols und De la Fuente (99) für Dünndarmschleimhaut angegebenen Hexokinase-Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Methode gemessen (99) Protein wurde mit einer Mikromodifikation der Biuretreaktion gemessen (19). 1 Enzymeinheit wurde definiert als 1 μ mol hydrolysiertes Disaccharid/ g Protein/ Minute.

d. Bestimmung der Dipeptidhydrolasen durch Messung von freien Aminosäuren.

Die quantitative Messung der Gly-Leu und Ala-Leu Dipeptidhydrolasen wurde nach der Methode von Auricchio und Mitarb. (11) durchgeführt. Dabei wurden die durch die Hydrolyse entstandenen freien Aminosäuren mit der L-Aminosäure-Oxidase aus dem Schlangengift der Crotalus adamanteus (lyophilisiertes Schlangengift von

Ross Allen Reptile Institut. Silver Springs, Fla, USA) gemessen. Die Reaktion basiert auf der oxidativen Desaminierung der freien Aminosäuren durch die Aminosäure-Oxidase gekoppelt mit der Oxidation von o-Dianisidin durch Wasserstoffperoxyd in Gegenwart von Peroxidase.

Eine Standardlösung der jeweils korrespondierenden Aminosäuren in einer Konzentration von $20 \mu\text{mol} / 100 \text{ ml}$ diene als Standardwert. 1 Enzymeinheit wurde definiert als $1 \mu\text{mol}$ hydrolysiertes Dipeptid/Minute/ mg Stickstoff, wobei man davon ausging, daß der Stickstoffgehalt 17% des Proteingehaltes beträgt (20).

Protein wurde wie schon erwähnt gemessen.

Alle verwendeten Substanzen waren chromatographisch rein.

ER G E B N I S S E

1. Bestimmung von Gesamtzuckergehalt, Milchsäurekonzentration und pH im Stuhl von Frühgeborenen, Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern sowie Kindern mit Diarrhoen.

Die Stuhlproben von 158 Kindern wurden untersucht, 43 davon waren Frühgeborene, 92 normale zum Termin geborene Neugeborene und Säuglinge und Kleinkinder, sowie 21 Kinder mit akuter oder chronischer Diarrhoe.

Abbildung 1 zeigt die Gesamtzuckerausscheidung von 81 normalen Neugeborenen und 33 Frühgeborenen. Die dargestellten kurvenförmigen Flächen enthalten alle gemessenen Werte. Die gestrichelte Kurve mit punktförmigem Raster repräsentiert die Gesamtzuckeraus-

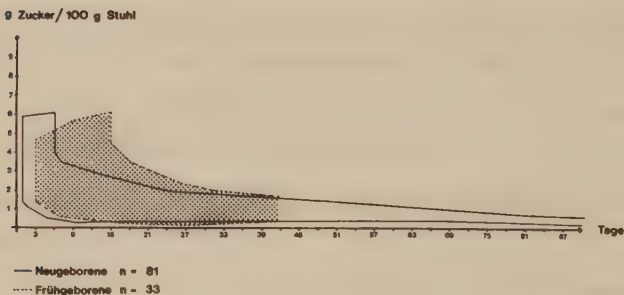


Abbildung 1

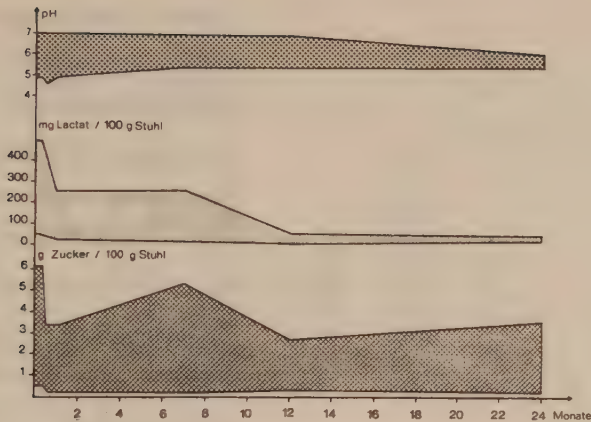


Abbildung 2

scheidung von Frühgeborenen. Sie beginnt erst am 3. Tag, da keine Stühle von diesen Frühgeborenen in den ersten 2 Lebenstagen gesammelt werden konnte. Die Gesamtzuckerausscheidung von Neugeborenen ist in den ersten 7 Lebenstagen hoch, fällt dann steil ab und verläuft flach abfallend im Sinne einer Exponentialkurve. Frühgeborene zeigen dieselben Verhältnisse mit der Ausnahme, daß der steile Abfall acht Tage später beginnt. Die Gesamtzuckerausscheidung von Frühgeborenen konnte nur bis zur 7. Woche verfolgt werden, da dies der durchschnittlichen Aufenthaltsdauer in der Klinik entsprach.

Abbildung 2 zeigt einen Überblick über die Gesamtzuckerausscheidung, Milchsäurekonzentration und pH im Stuhl von 91 Kindern verschiedenen Alters. Es sind jeweils die Streubreiten der gemessenen Werte eingetragen. Hierbei ist zu erkennen, daß der Gesamtzuckergehalt insgesamt abnimmt, daß aber die Streubreiten aller drei Parameter beträchtlich variieren.

Abbildung 3 zeigt die Mittelwerte von Gesamtzuckergehalt, Milchsäurekonzentration und pH im Stuhl von Neugeborenen in den

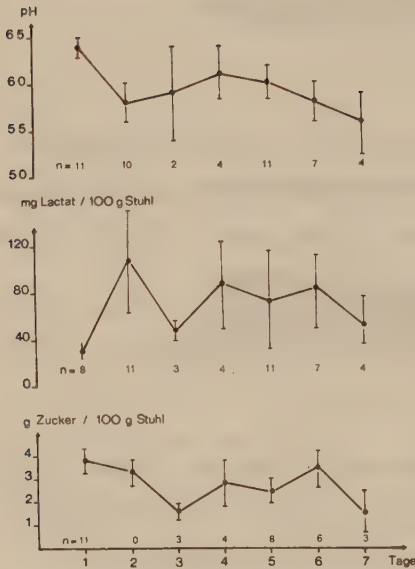


Abbildung 3

ersten sieben Lebenstagen. Vom ersten zum zweiten Lebenstag zeigt die Zuckerausscheidung eine abfallende Tendenz, die entgegengesetzt zur Milchsäureausscheidung verlaufend am 2. Tag ein Maximum erreicht und dann steil am 3. Lebenstag abfällt. Vom 3. Tag an ist ein Anstieg der Zuckerkonzentration im Stuhl von einem Anstieg der Milchsäure begleitet. Der pH-Wert zeigt keine Korrelation mit der Milchsäureausscheidung. Die Milchsäurekonzentration im Stuhl von Frühgeborenen ist signifikant niedriger ($p < 0.05$) als die von Neugeborenen wie aus Abbildung 4 zu ersehen ist. Der Mittelwert des Milchsäuregehaltes von 3 Neugeborenen mit Durchfällen ist höher als bei normalen Neugeborenen. Jedoch ist der Unterschied nicht statistisch zu sichern. Ebenfalls ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem Zuckergehalt im Stuhl von Früh- und Neugeborenen mit Durchfällen. Der pH-Wert des Stuhls von Neugeborenen mit Durchfällen ist nicht signifikant erniedrigt im Vergleich mit der normalen Kontrollgruppe. Der pH-Wert von Frühgeborenen ist aber signifikant höher ($p < 0.05$) als der von Neugeborenen.

Abbildung 5 zeigt die drei Parameter Gesamtzuckergehalt, Milchsäurekonzentration und pH im Stuhl von normalen Säuglingen

ersten sieben Lebenstagen. Vom ersten zum zweiten Lebenstag zeigt die Zuckerausscheidung eine abfallende Tendenz, die entgegengesetzt zur Milchsäureausscheidung verlaufend am 2. Tag ein Maximum erreicht und dann steil am 3. Lebenstag abfällt. Vom 3. Tag an ist ein Anstieg der Zuckerkonzentration im Stuhl von einem Anstieg der Milchsäure begleitet. Der pH-Wert zeigt keine Korrelation

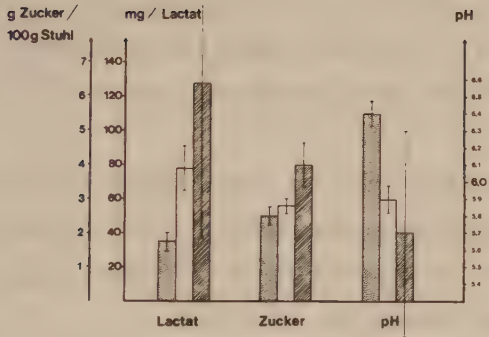


Abbildung 4: =Frühgeborene, =Neugeborene und

=Neugeborene mit Diarrhoe

Bereiche = Mittelwert $\pm$ S.E.M.

n = 36

n = 68

n = 3

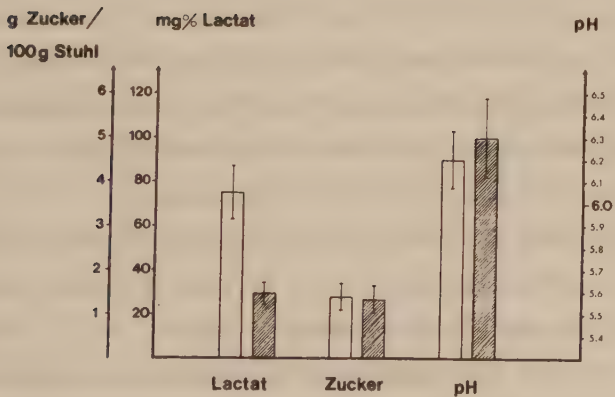


Abbildung 5: =normale Säuglinge und Kleinkinder und

solche mit Diarrhoeen

Bereiche = Mittelwert $\pm$ S.E.M.

n = 24

n = 17

und Kleinkindern sowie Säuglingen und Kleinkindern mit Diarrhoen. Die Milchsäurekonzentration im Stuhl von normalen Säuglingen ist signifikant höher als die im Stuhl von Säuglingen mit Durchfällen. Zuckergehalt und pH unterscheiden sich nicht signifikant in beiden Gruppen.

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Identifikation der einzelnen Zucker mittels Dünnschichtchromatographie sowie die Zuckerspektren im Stuhl von Frühgeborenen, Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern und Kindern mit Diarrhoen.

Bei allen Frühgeborenen wurde Zucker im Stuhl gefunden. Im Stuhl von Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern zu 95 % und im Stuhl von Kindern mit Durchfällen zu 97%.

Die am häufigsten ausgeschiedenen Monosaccharide bei Frühgeborenen waren: Galactose zu 81%, Glucose zu 48%, und Fructose zu 23%, die am häufigsten ausgeschiedenen Disaccharide: Lactose zu 18% und Palatinose zu 16%.

Neugeborene, Säuglinge und Kleinkinder zeigten das gleiche Verhältnis mit einer Ausnahme, daß die Glucose mit 75% der am häufigsten ausgeschiedene Zucker war. Das Ausscheidungsmuster von Zuckern bei Kindern mit Durchfällen zeigte nahezu keinen Unterschied mit dem der normalen Kontrollgruppe.

Bemerkenswert ist nur, dass die prozentuale Ausscheidung von Fucose bei Kindern mit Durchfällen größer und die von Oligosacchariden geringer als bei Normalen war.

Auch hinsichtlich der Quantitäten der dünn-schichtchromatographisch identifizierten Zucker ergab sich kein Unterschied zwischen Normalpersonen und Kindern mit Diarrhoen. So wurde auch in den Stuhlproben von 7 Kindern mit Malabsorptions-

	Frühgeborene		Neugeborene, Saugl u. Kleinkinder		Kinder mit		Durchfällen	
	n	%	n	%	n	%	n	%
	43	100	97	100	28	100		
Zucker gesamt i. St.	43	100	87	95	27	97		
Glucose	21	48	69	75	20	71		
Galactose	35	81	56	60	11	39		
Fructose	10	23	19	20	7	25		
Fucose	5	11	20	21	11	39		
Galacturonsäure	1	3	15	16	3	10		
Xylose	2	4	5	5	1	3		
Arabinose	2	4	2	2	3	10		
Ribose	2	4	1	1	2	7		
Rhamnose	-	-	3	3	2	7		
Lactose	8	18	20	21	4	14		
Maltose	1	3	3	3	1	3		
Palatinose	7	16	14	15	-	-		
Oligosaccharide	5	11	20	21	1	3		
Nicht identifizierte	-	-	28	30	4	14		

Tabelle 1

syndromen nach einer Lactose-, bzw. Glucose-Galactosebelastung mit 2 g Lactose bzw 1 g Glucose oder Galactose pro kg Körpergewicht keine erhöhte Milchsäurekonzentration oder eine vermehrte Zuckerausscheidung respektive niedriger pH gefunden.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung dieser Stuhlproben zeigte in keinem Fall eine vermehrte Ausscheidung von Mono- oder Disacchariden. Wenn mit diesem Ergebnis auch die Erwartungen hinsichtlich einer diagnostischen Brauchbarkeit von derartigen Stuhlanalysen enttäuscht wurden, so taucht doch die Frage auf, woher die im Stuhl ausgeschiedenen Zucker eigentlich kommen.

Zur Klärung dieser Frage wurden zunächst alle Nahrungsmittel der untersuchten Kinder erfaßt und eine Zuckeranalyse dieser Nahrungsmittel mittels Dünnschichtchromatographie durchgeführt.

Die Ernährung der untersuchten Kinder setzte sich aus folgenden Nahrungen zusammen: Hippon 1 und 2, Multival FF und F 16, Nutramigen, Lactopriv, Multival 1 und 2, Aptamil, Humana O und 1, Tee mit Glucose, Glucose 5%, Phenylketonuriediät, Normalkost und

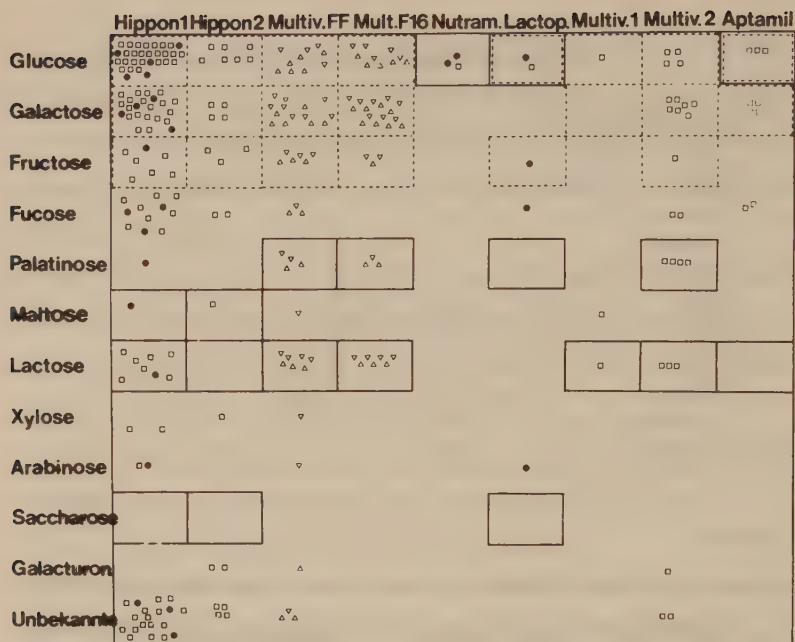


Abbildung 6: Zuckerausscheidung im Stuhl in Abhängigkeit von der verabreichten Nahrung

Muttermilch. In Abbildung 6 und 7 wurden die einzelnen dünnsschicht-chromatographisch erfaßten Zucker im Stuhl der Kinder unter der jeweils verfütterten Nahrung eingetragen und die in der betreffenden Nahrung enthaltenen Zucker mit aufgeführt. Die in den Nahrungen enthaltenen Zucker sind als schwarz ausgezogene rechteckige Felder dargestellt, ihre Spaltprodukte als gestrichelte Rechtecke eingezeichnet. So enthält die teiladaptierte Milch Hippon 1 die Disaccharide Maltose, Saccharose und Lactose. Die Spaltprodukte davon sind Glucose aus Maltose, Lactose und Saccharose; Galactose aus Lactose und Fructose aus Saccharose.

Welche Zucker bei den verabfolgten Nahrungen ausgeschieden wurden, ist für die verschiedenen Kinder mit besonderen Symbolen kennt-

	Hum. O	Hum. 1	Tee-Gluc.	Gluc. 5%	PKU-D	Normal	Mutter-M.
Glucose	□□	□□□□□□□□	●●	▽	□□	●●●●●	□□□□□□□□
Galactose	□	□□□□□□□□	●			●●●	□□□□□□□□
Fructose		□□	●			●●●	□□□□
Fucose			●●	▽		●●	□□□□
Palatinose		□□□□□□					□□□□□□
Maltose		□					□
Lactose		□□□□□□	●●			●	□□□□□□
Xylose				▽		●●	
Arabinose				△		●	
Saccharose							
Galacturon	□	□□□□□□	□□			●●●	□□□
Unbekannte		□□□□□□					

Abbildung 7 : Erklärung siehe Text

lich gemacht: Frühgeborene mit einem kleinen Dreieck, Neugeborene Säuglinge und Kleinkinder mit einem Quadrat und Kinder mit Durchfällen mit einem schwarzen Punkt. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen, daß die im Stuhl der 3 Gruppen identifizierten Mono- und Disaccharide sich mit denen in der Nahrung vorhandenen häufig decken. Saccharose wurde in keinem Fall wiedergefunden. Bezeichnend ist der hohe Anteil an ausgeschiedener Glucose und Galactose als Ausdruck der hydrolytischen Kraft im Dünn- und Dickdarm. Bezüglich des Zuckerspektrums gibt es keinen Unterschied zwischen gesunden und kranken Kindern. Ein relativ großer Anteil der gefundenen Zucker war unbekannt und konnte nicht identifiziert werden. Die nicht in der Nahrung vorhandenen Zucker - dies gilt für

Arabinose, Xylose, Palatinose, Galacturonsäure und die nicht identifizierten Zucker-, müssen als bakterielle Spalt- oder Umwandlungsprodukte anderer Zucker, so etwa Oligosaccharide und Polysaccharide angesehen werden.

2. Bestimmung der Disaccharidasen aus Dünndarmschleimhaut, die mittels Biopsie gewonnen wurden.

Die Ergebnisse der Enzymbestimmung mit der Dünnschichtchromatographie sind in den Abbildungen 8 bis 10 zu sehen. Am unteren Rand ist der Startpunkt markiert, der tief dunkle Fleck in der Mitte des Bildes repräsentiert das Substrat (Lactose) und die zwei Flecken darüber stellen Monosaccharide dar, die durch das ent-Enzym - in diesem Fall die Lactase - als hydrolytische Produkte entstanden, nämlich Glucose und Galactose.

Wird Maltose als Substrat aufgetragen für die Bestimmung der Maltase 1 und 2, werden außer dem hydrolysierten Monosaccharid Glucose noch zwei andere Flecken sichtbar, die unterhalb der Maltose liegen. Diese sind Oligosaccharide, die durch eine Transglykosidaseaktivität der Maltasen im Homogenisat entstehen(30).

Aktivität der Disaccharidasen : Lactase
Fließmittel: 0,016 m Borsäure in Isopropanol / n-Butanol / Wasser 50:30:20
Valkmann 0 30 60 90 Min.

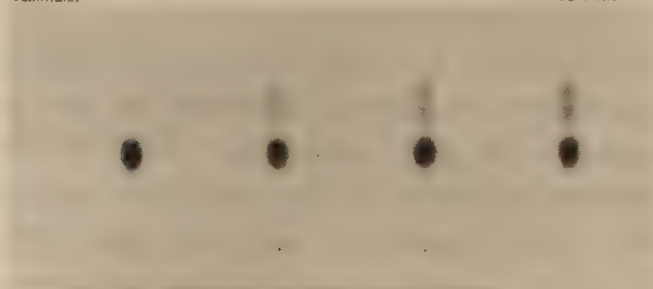


Abbildung 8: Normale Lactaseaktivität mit der Bewertung
+++ oder ++

Aktivität der Disaccharidasen : Lactase
Fließmittel: 0,016 m. Borsäure in Isopropanol / n-Butanol / Wasser 50:30:20
Klinger 0 30 60 90 Min.

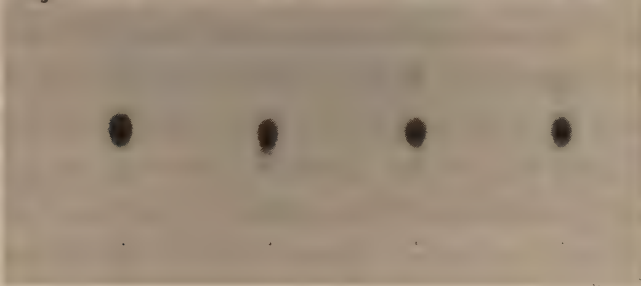


Abbildung 9: Erniedrigte Lactaseaktivität mit der Bewertung: +
Bei der Bestimmung der Isomaltase (Maltase 5) erscheinen, da Palatinose als Substrat dient, die Monosaccharide Glucose und Fructose ebenso wie bei der Bestimmung der Saccharase (Maltase 3 und 4). Die Intensität der Monosaccharidflecken wurde in 4 Grade eingeteilt und als Enzymaktivität der entsprechenden Disaccharidase ausgedrückt. Normale Aktivität: +++ oder ++, so wie es in Abbildung 8 für die Lactaseaktivität gezeigt ist; erniedrigte Aktivität: +, wie es in Abbildung 9 für eine erniedrigte Lactaseaktivität gezeigt ist und fehlende Aktivität : 0, wie in Abbildung 10 bei einem Kind mit Lactasedefizienz auf Grund einer Zöliakie bei mikroskopisch total flacher Mukosa gezeigt wird.

Aktivität der Disaccharidasen : Lactase
Fließmittel: 0,016 m. Borsäure in Isopropanol / n-Butanol / Wasser 50:30:20
Aigner 0 30 60 90 Min.

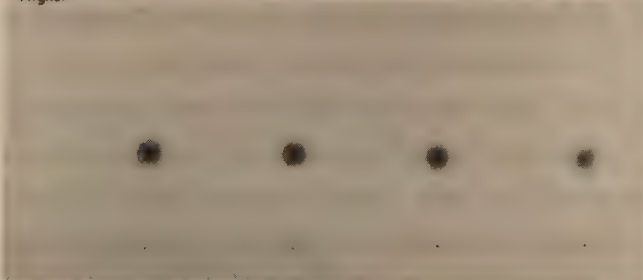


Abbildung 10: Lactasedefizienz mit der Bewertung : 0

Untersucht wurde die Dünndarmschleimhaut von 30 Kindern im Alter von 2 Monaten bis 16 Jahren, die in der Münchener Universitätskinderklinik wegen gastrointestinaler Symptome stationär lagen. 15 Kinder hatten zwar gastrointestinale Symptome, morphologisch war aber die Dünndarmmukosa nach stereomikroskopischer und histologischer Untersuchung normal. Diese wurden als Normalpersonen den anderen Kindern ($n = 15$) mit veränderter Mukosastruktur gegenübergestellt.

Um die Resultate der dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen vergleichen zu können, wurden alle Disaccharidasen gleichzeitig quantitativ mit der Hexokinase-Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Methode gemessen.

Tabelle 2 zeigt die Normalwerte von Maltase, Isomaltase, Saccharase und Lactase, die mit der quantitativen Methode gemessen wurden im Vergleich mit den Normalwerten anderer Autoren.

Die Enzymaktivität ist definiert als $1 \text{ U} = 1 \mu\text{mol}$ hydrolysiertes Disaccharid /g Protein/ Minute. Alle Werte sind angegeben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung und die Streubreite.

Bei 3 Kindern konnten die Disaccharidasen nicht quantitativ gemessen werden, da die Menge des Gewebes nicht ausreichte.

Die gleichzeitige Bestimmung der Disaccharidasen mit der Dünnschichtchromatographie dieser 15 Normalpersonen ergab bei 14 Kindern ein dreifach positives Resultat: +++ . 1 Kind hatte die Aktivität ++, die Maltase und Lactase betreffend.

Um die Empfindlichkeit der dünn-schichtchromatographischen Methode gegenüber der enzymatischen Methode vergleichen zu können, wurde folgende Versuchsanordnung gewählt: eine Verdünnungsreihe mit bekannten Glucosekonzentrationen wurde mit der HK-G-6-PDH Methode

1 U = 1 μ mol hydrolysiertes Disaccharid / g Protein / Min

	Maltase	Isomaltase	Saccharase	Lactase	
Dunphy et al. n = 22	266 $\pm$ 70 111 - 420	97 $\pm$ 30 25 - 183	87 $\pm$ 29 26 - 138	44 $\pm$ 22 9 - 98	M* S°
Burke et al. n = 5	260 83 - 615	89 31 - 177	95 32 - 228	49 14 - 132	
Auricchio et al. n = 8	154 45 - 357	66 35 - 91	60 28 - 89	31 10 - 61	
Eigene Normal- werte n = 12	198 $\pm$ 69 57 - 289	58 $\pm$ 19 31 - 89	78 $\pm$ 36 27 - 136	43 $\pm$ 18 17 - 83	

Tabelle 2: Normalwerte von 12 Kindern verglichen mit denen von Dunphy(40), Burke(23) und Auricchio(14)

gemessen und die so bestimmten Konzentrationen ebenso wie bei der Messung der Disaccharidasen bei einem mittleren Proteinwert von 100 mg/g Gewebe, der sich aus den Gewebeproben der 30 untersuchten Kinder errechnete, auf Enzymaktivität/g Protein/Min umgerechnet. Anschließend wurden je 2 μ l jeder Glucoselösung auf Dünnschichtplatten aufgetragen und der Fleck mit der geringsten Konzentration, der gerade noch sichtbar wurde, als untere Empfindlichkeitsgrenze angesehen. Auf die Disaccharidasen bezogen ergaben sich folgende Aktivitäten:

für Maltase	21.2 μ mol/g Protein/Min
für Isomaltase	8.6 μ mol/g Protein/Min
für Saccharase	8.5 μ mol/g Protein/Min
für Lactase	8.5 μ mol/g Protein/Min

Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse bei 15 Kindern mit unspezifischen Durchfällen mit der Diagnose einer Zöliakie. In nur zwei Fällen waren keine Strukturveränderungen der Mukosa histologisch mehr

Patienten	Alter u. Geschlecht	Maltase	Iso- maltase	Saccha- rase	Lactase	Mukosa stereo- mikroskopisch
1. W.G.	1 ⁴ ₁₂	92.5	34.8	nicht gem	10.7 A	totale Zottenatrophie
		+++	+++	+++	+ B	
2. B. A.	6 ⁵ ₁₂	65.5	17.5	nicht gem	2.6	totale Zottenatrophie
		+++	++	+++	0	
3. B. W.	2 ¹ ₁₂	52.0	15.2	11.2	4.7	totale Zottenatrophie
		++	++	+	0	
4. G. E.	16	38.6	9.1	7.8	1.1	totale Zottenatrophie
		+	0	0	0	
5. H. M.	6 ⁶ ₁₂	69.8	25.4	19.2	8.6	totale Zottenatrophie
		+++	++	++	+	
6. S. V.	11 ¹ ₁₂	122.5	54.0	42.5	12.5	totale Zottenatrophie
		+	+	+	+	
7. R. R.	1 ⁴ ₁₂	58.6	13.0	16.2	0	totale Zottenatrophie
		++	++	++	0	
8. F. R.	5 ² ₁₂	77.5	26.1	25.3	0.6	totale Zottenatrophie
		+++	++	++	0	
9. K. W.	2 ³ ₁₂	154.5	46.5	59.7	17.1	partielle Zottenatroph.
		+++	++	+++	+	
10. R. K.	6 ² ₁₂	48.2	22.5	21.7	2.4	partielle Zottenatroph.
		+++	++	+++	0	
11. S. M.	1 ³ ₁₂	+++	+	++	+	totale Zottenatrophie
12. K. W.	2 ³ ₁₂	+++	++	+++	+	Mukosa i. Remission
13. K. C.	1 ⁶ ₁₂	+++	+	+	+	partielle Zottenatrophie
14. F. R.	1 ⁶ ₁₂	+++	++	+++	+	totale Zottenatrophie
15. L. K.	5 ⁷ ₁₂	++	+	++	0	totale Zottenatrophie

Tabelle 3: Aktivitäten der Disaccharidasen von 15 Patienten mit Coeliakie, gemessen mit der Dünnschichtchromatographie und der quantitativen HK G-6-PDH Methode.

A.: HK G-6-PDH, 1 μ mol Disaccharid/g Protein/Min

B.: Dünnschichtchromatographie

feststellbar, die Gewebe von 5 Kindern konnten nicht mit der HK G-6-PDH Methode gemessen werden, da die Menge der biopsisch gewonnenen Schleimhaut zu gering war.

In allen Fällen zeigte sich eine erniedrigte Lactaseaktivität übereinstimmend mit beiden Methoden mit Ausnahme von Fall 9, wo die quantitativ gemessene Lactase einen Grenzwert von 17.1 μ mol/g Protein/Min ergab, bezogen auf die Streubreite wie sie in Tabelle 2 für die Normalwerte der Lactase angegeben sind. In Fall 4

war zusätzlich eine Isomaltase-Saccharasedefizienz und eine erniedrigte Maltaseaktivität vorhanden.

Die in allen Fällen vorhandene Lactasedefizienz ist auf die bei diesen Kindern vorhandene Gluten-induzierte Enteropathie zurückzuführen. Sie ist die häufigste Ursache der sekundären Disaccharidasendefizienz bei Kindern (30) (50) (77).

3. Ergebnisse der Bestimmung der Dipeptidhydrolasen aus bioptisch gewonnener Dünndarmschleimhaut.

11 Dipeptidhydrolasen und die Disaccharidasen Maltase, Isomaltase, Saccharase und Lactase wurden aus intestinalen Biopsiematerial von 60 Kindern im Alter von 1 Monat bis zu 6 Jahren gemessen.

Die untersuchten Kinder wurden in 4 Gruppen eingeteilt:

Gruppe I: enthielt 22 Kinder mit gastrointestinalen Symptomen, aber stereomikroskopisch und histologisch normaler Mukosa.

Gruppe II: enthielt 10 Kinder mit den klinischen und morphologischen Zeichen einer akuten Zöliakie. Histologisch und stereomikroskopisch: total flache Mukosa. Diese Kinder waren noch unbehandelt.

Gruppe III: enthielt 16 Kinder mit Zöliakie nach Behandlung. Stereomikroskopisch und histologisch konnte eine partielle Zottenatrophie bzw. eine leichte Reduktion des Höhensaaues festgestellt werden.

Gruppe IV: enthielt 12 Kinder mit den klinischen Zeichen eines Malabsorptionssyndromes, das oft ganz verschiedenen Ursprungs war: eines dieser Kinder hatte eine Mukopolysaccharidose vom Typ Sanfilippo, eines eine Hypogammaglobulinämie, ein anderes eine gammaG-Lambda-Gammopathie, eines mit Verdacht auf primäre

Lactasedefizienz und andere mit Durchfällen, hervorgerufen durch bakterielle Infektionen. Alle diese Kinder hatten morphologische Veränderungen in der intestinalen Mukosa, von leichten Reduktionen in der Schleimhautoberfläche bis zur totalen Zottenatrophie. Bei allen 60 Kindern wurden die Dipeptidhydrolasen und Disaccharidasen mit der Dünnschichtchromatographie gemessen.

Parallel zu diesen Untersuchungen wurden die Gly-Leu und die Ala-Leu Dipeptidhydrolasen dieser Patienten mit der Aminosäure-Oxidase Methode nach Auricchio und Mitarb. (11) bestimmt.

Alle Bestimmungen wurden mit Mukosahomogenisat durchgeführt.

Die Ergebnisse der dünnschichtchromatographischen Untersuchungen zeigen die Abbildungen 11, 12 und 13. Abbildung 11 zeigt auf der linken Seite die Aktivität der Glu-Val Dipeptidhydrolase einer Normalperson. Am unteren Rand der Platte ist der Startpunkt markiert. Der intensiv angefärbte Fleck bei 0 Minuten repräsentiert das Substrat, in diesem Fall Glu-Val. Bei 15, 30, 60 und 90 Minuten sind die freien Aminosäuren Glutaminsäure und Valin sichtbar, die durch die korrespondierende Dipeptidhydrolase hydrolysiert wurden. Die freien Aminosäuren können durch die

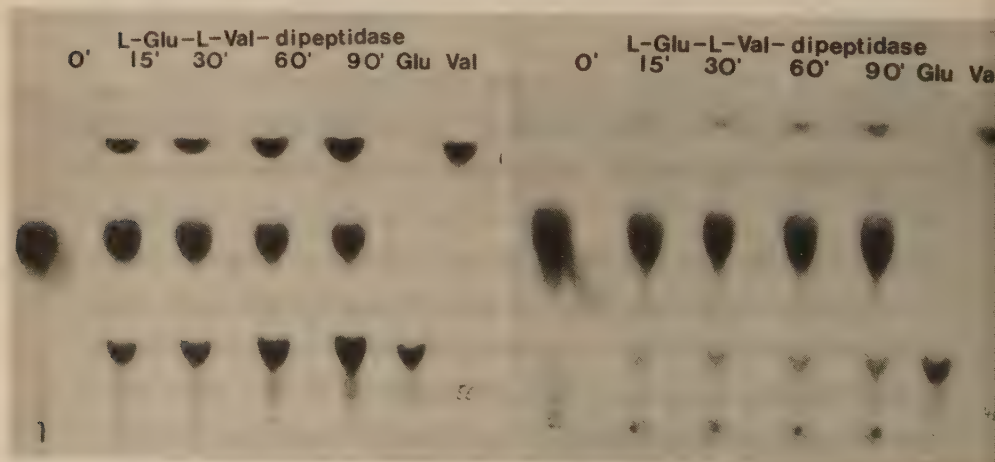


Abbildung 11: links normale Glu-Val Dipeptidhydrolase-aktivität
rechts verminderte Glu-Val Dipeptidhydrolase-aktivität



Abbildung 12. Links: Normale Ala-Glu Dipeptidhydrolaseaktivität +++ . Rechts: leicht verminderte Ala-Glu Dipeptidhydrolaseaktivität ++, von einem Patienten mit chronischen Durchfällen.

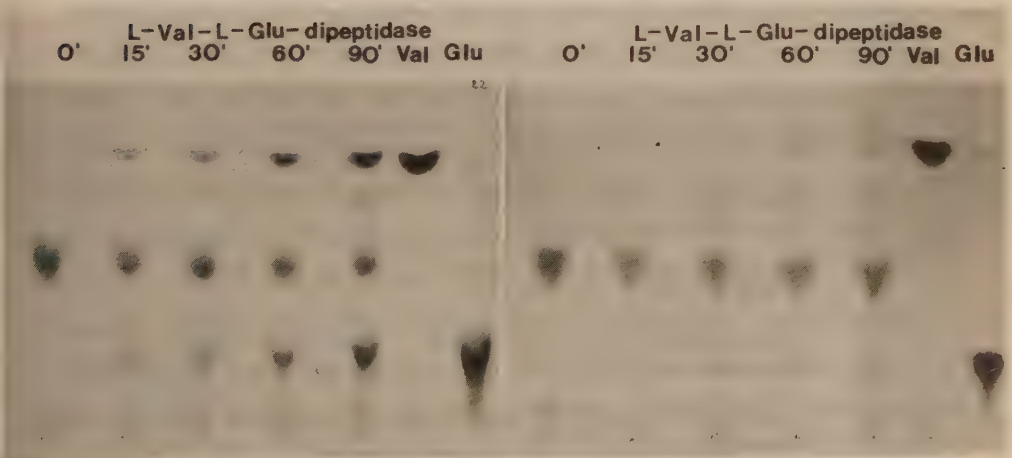


Abbildung 13. Links normale Val-Glu Dipeptidhydrolaseaktivität: +++ . Rechts: fehlende Val-Glu Dipeptidhydrolaseaktivität: 0, bei einem Patienten mit unbehandelter Zöliakie.

mitaufgetragenen Marker-Substanzen identifiziert werden.

Die Flecken der freien Aminosäuren wurden ebenso wie bei den Disaccharidasen in 4 Intensitätsgrade eingeteilt:

Normale Aktivität: +++, leicht verminderte Aktivität: ++, wobei das Dipeptid noch bei 30, 60 und 90 Minuten sichtbar bleibt wie es in Abbildung 12 auf der rechten Seite für die Aktivität der Ala-Glu Dipeptidhydrolase zu sehen ist, wo die Flecken von Glutaminsäure und Valin nur schwach zu sehen sind. Erscheinen keine freien Aminosäuren oder nur andeutungsweise wie in Abbildung 13 auf der rechten Seite, wurde diese fehlende Aktivität als 0 bezeichnet.

Die linken Seiten der Abbildungen 11, 12 und 13 zeigen normale Aktivitäten (++++) der Glu-Val, Ala-Glu und Val-Glu Dipeptidhydrolasen von Normalpersonen. Abbildung 11 zeigt auf der rechten Seite die Aktivität der Glu-Val Dipeptidhydrolase eines Kindes mit unbehandelter Zöliakie unter dem histologischen Bild einer subtotalen Zottenatrophie. Abbildung 12 zeigt auf der rechten Seite

1 U Enzym = 1 µmol hydrolysiertes Dipeptid / Min / mg N			
	Gly - Leu	Ala - Leu	
Gruppe I: Normale n = 22	68.2 ± 1.23	51.4 ± 1.2	M ^o
	17.3 - 428	16.4 - 219	S [*]
Gruppe II: Unbehandelte Zöliakie n=10	17.6 ± 1.67 p<0.01 I/II	18.8 ± 1.4 p<0.01 I/II	
	2.9 - 229	5.1 - 152	
Gruppe III: Behandelte Zöliakie n = 17	51.1 ± 1.33 n.s. I/III	40.9 ± 1.2 n.s. I/III	
	5.4 - 333	8.1 - 142	
Gruppe IV: Kinder mit Symptomen e. Malabsorption n=12	26.2 ± 1.41 p<0.05 I/IV	25.8 ± 1.3 p<0.05 I/IV	
	5.0 - 162	9.2 - 140	

Tabelle 4

M^o = Mittelwert ± S.E.M.

S^{*} = Streubreite

eine leicht verminderte Aktivität der Ala-Glu Dipeptidhydrolase bei einem Patienten aus Gruppe IV und Abbildung 13 zeigt rechts fehlende Aktivität der Val-Glu Dipeptidhydrolase bei einem Kind mit total flachen Mukosa bei unbehandelter Zöliakie. Die Ergebnisse der quantitativen Messung der Gly-Leu und Ala-Leu Dipeptidhydrolase zeigt Tabelle 4.

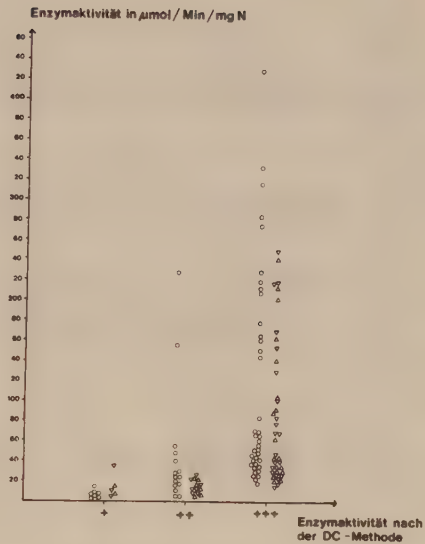


Abbildung 14 O=Gly-Leu Δ=Ala-Leu

Übereinstimmend mit Berg und Mitarb. (20) fanden wir eine log-normale Verteilung der Gly-Leu und Ala-Leu Dipeptidhydrolase. Daher wurden alle statistischen Berechnungen mit der log x-Transformation der einzelnen Werte durchgeführt.

In der Gruppe der Kinder mit unbehandelter Zöliakie und total flacher Mukosa war die Gly-Leu Dipeptidhydrolase signifikant erniedrigt gegenüber der Normalgruppe, ebenso die Ala-Leu Dipeptidhydrolase. Nach Behandlung mit glutenfreier Kost waren die Aktivitäten der Gly-Leu und Ala-Leu Dipeptidhydrolasen im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht mehr signifikant erniedrigt.

Abbildung 14 zeigt nun den Vergleich der beiden Methoden, Dünnschichtchromatographie und Aminosäure-Oxidase-Methode für die

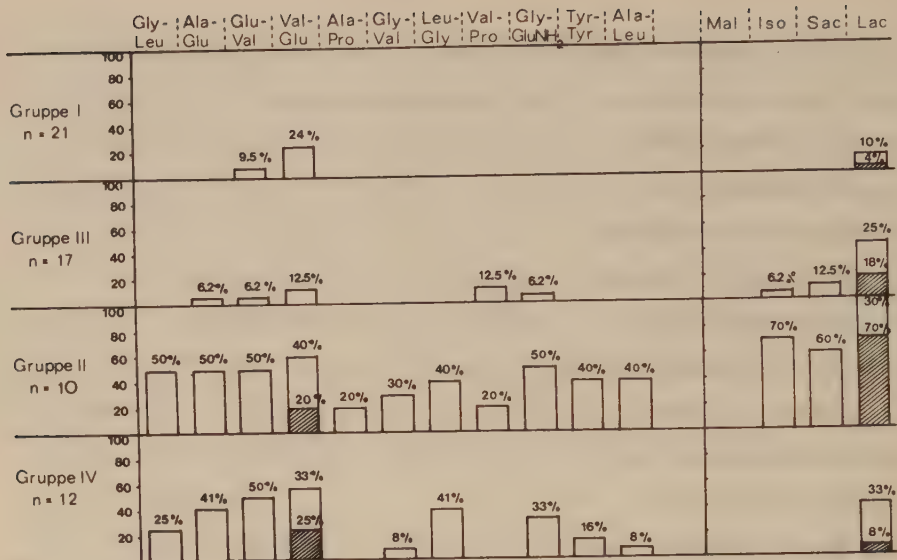


Abbildung 15

Gly-Leu und Ala-Leu Dipeptidhydrolasen. Auf der Abszisse sind alle gemessenen Werte aufgetragen, die mit der Dünnschichtchromatographie bestimmt wurden und als +, ++ oder +++ bewertet wurden.

Auf der Ordinate sind die Werte derselben Proben aufgetragen, in diesem Fall mit der quantitativen Methode gemessen und als μmol hydrolysiertes Dipeptid/Min/ mg Stickstoff ausgedrückt.

Die Aktivitäten der Gly-Leu Dipeptidhydrolase sind als Kreise, die der Ala-Leu Dipeptidhydrolase als Dreiecke dargestellt.

Die lognormale Verteilung der beiden Enzyme bei nichtlogarithmischer Darstellung in dieser Abbildung erklärt die große Streubreite.

Die dünnschichtchromatographisch bestimmten Werte korrelieren gut mit den quantitativ gemessenen. Die mit + und ++ bezeichneten Aktivitäten zeigen in den niedrigen Bereichen Überschneidungen.

Auf jeden Fall kann aber eine als ++ bewertete Aktivität als

vermindert angesehen werden. Die Ergebnisse der dünn-schicht-chromatographischen Untersuchungen und der Bestimmung der Gly-Leu, Ala-Leu, Glu-Val, Val-Glu, Ala-Pro, Gly-Val, Leu-Gly, Val-Pro, Gly-GluNH₂, Tyr-Tyr und Ala-Leu Dipeptidhydrolasen von 60 Kindern sowie der Disaccharidasen Maltase (Mal), Isomaltase (Iso), Saccharase (Sac) und Lactase (Lac) sind in Abbildung 15 zu sehen. Die Säulen geben den Anteil der Gesamtzahl der Kinder in Prozent an, die mit + (erniedrigte Aktivität) bzw. 0 (fehlenden Aktivität = gestrichelte Säulen) bewertet wurden.

Dabei ist das Verhalten der Enzymaktivitäten unter normalen und pathologischen Bedingungen zu ersehen. Die Dipeptidhydrolasen Tyr-Tyr und Ala-Leu, über die es in der Literatur bisher keine Angaben gibt, verhalten sich dabei genauso wie die anderen aufgeführten Dipeptidhydrolasen : sie sind erniedrigt bei Kindern mit unbehandelter Zöliakie (Gruppe II) und annähernd normal nach Behandlung mit gluten freier Kost, wie in Gruppe III der Kinder mit behandelter Zöliakie zu sehen ist. Hier sind die Dipeptidhydrolasen nur leicht oder gar nicht vermindert.

Was die Disaccharidasen betrifft, so zeigen 70% der Kinder der Gruppe II mit unbehandelter Zöliakie eine Lactasedefizienz, die Aktivitäten der Isomaltase und Sacchrase sind auch zu einem großen Prozentsatz vermindert.

In der Gruppe III ist die Lactase mehr vermindert als die Isomaltase und Saccharase. Gruppe IV zeigt eine Verminderung der Dipeptidhydrolasen verschiedenen Ausmaßes mit Ausnahme der Ala-Pro und Val-Pro Dipeptidhydrolasen. 41% dieser Kinder in der Gruppe IV haben eine verminderte Lactaseaktivität.

D I S K U S S I O N

Mit dem Rückgang der infektiösen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes und der Beherrschung dieser Krankheiten durch die moderne antibiotische Therapie, treten zunehmend metabolische Störungen des Magen-Darm-Traktes in den Vordergrund. Diese Stoffwechselstörungen verlangen eine differenzierte Diagnostik.

Bei der primären Disaccharidasendefizienz, so etwa der Saccharase-Isomaltase-Defizienz und der Lactose-Intoleranz, wird die Diagnose meist durch die häufig in der Klinik verwandte Methode mit der Exposition des Patienten des vermutlich beteiligten Zucker gestellt : man bestimmt durch die Messung der Blutglucose die mangelnde Absorption. Im Falle der Erkrankung steigt der Blutzuckerspiegel oder der Fructose- bzw. Galactosespiegel i. Blut nicht an, sondern nimmt einen flachen Verlauf (109). Die gleichen Verhältnisse liegen bei der Glucose-Galactose-Malabsorption vor (74).

Will man eine vermutete Saccharase-Isomaltase-Defizienz diagnostizieren, muß man das Kind zunächst mit Saccharose belasten und die entsprechenden Blutzuckerspiegel messen. Anschließend wird die Exposition mit Glucose und Fructose wiederholt- hier sollte ein normaler Anstieg der jeweiligen Spiegel vorliegen- und schließlich muß man eine dritte Belastung mit Glucose und Galactose durchführen, um eine Glucose-Galactose-Malabsorption nicht zu übersehen.

Diese Maßnahmen bedeuten für das Kind eine doppelte Belastung. Einerseits werden profuse Durchfälle provoziert, andererseits wird das Kind durch eine Fülle von Venenpunktionen physisch

und psychisch beansprucht.

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, mit Hilfe einfacher Methoden einen Aufschluß über die Art des vorliegenden metabolischen Defektes zu gewinnen. Zunächst sollen die Ergebnisse der aus dem Stuhl bestimmten Zucker diskutiert werden, anschließend die der direkten Enzymbestimmung aus menschlicher Dünndarmmukosa, die durch Saugbiopsie gewonnen wurde.

Bei der Bestimmung der folgenden Parameter: Zuckergehalt, Milchsäurekonzentration sowie pH im Stuhl, und der Identifikation der einzelnen Zucker durch die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Stuhlsuspension, steht man vor folgenden wichtigen Fragen: 1. erlauben die Bestimmungen dieser Parameter einen Rückschluß auf die Verdauung der Kohlenhydrate im Darm?, 2. lassen die gefundenen Ergebnisse einen bindenden Schluß auf eine bestehende Zuckermalabsorption zu, sei es auf Grund einer angeborenen oder erworbenen Disaccharidasendefizienz oder auf Grund einer Glucose-Glactose-Malabsorption?, 3. stehen die Konzentrationen der drei oben genannten Parameter in einer Korrelation, die es gestattet, eine Aussage über die Malabsorption zu machen?

Die im Stuhl ausgeschiedenen Zuckermengen hängen im wesentlichen von folgenden Faktoren ab: der Absorptionsrate im Darm bzw. der Enzymaktivität, dem Abbau durch die Darmkeime, die durch die Keimzahl festgelegt ist, und von der Passagezeit.

Die Aktivitäten der α - und β -Glycosidasen der "brush border region" der Mikrovilli der Dünndarmmukosa sind bei normalen am Termin geborenen Neugeborenen maximal (13). Die Absorptionsrate von Monosacchariden per aktiven Transport oder Diffusion ist nach

den Untersuchungen von Linneweh(76) mit Isotopen markierten Monosacchariden bei Normalpersonen 90.2 %.

Der Rest der Kohlenhydrate, der dann noch im Darmlumen verbleibt, unterliegt den weiteren Faktoren, die oben erwähnt sind.

Die Besiedlung des Darms nach der Geburt erreicht zwischen dem 4. und 6. Tag in einer exponentiellen Zunahme der Keimzahl ihren Höhepunkt (56). Ebenso ist die zu 90% aus *Bacterium bifidum* bestehende Darmflora bei Brustkindern in der Mehrzahl der Fälle am 5. und 6. Tag voll ausgebildet (42).

Diese Beobachtungen stimmen gut mit dem in Abbildung 1 gefundenen Verlauf der Zuckerausscheidung überein, wo nach 6 Tagen bei Neugeborenen ein Abfall der Zuckerausscheidung eintritt, der umgekehrt proportional zu der oben erwähnten Kurve der Keimbefiedlung verläuft. Bei maximaler Entwicklung der Absorptions- und Hydrolysemechanismen liegt also Grund zur Annahme vor, daß die Zuckerausscheidung im Stuhl nach dem 5. Lebenstag in Korrelation zur Keimzahl steht. Die Schwankungsbreiten sind aber sehr groß und die jeweils verabreichte Nahrung nicht berücksichtigt.

Die Abhängigkeit zwischen der Höhe der Zuckerausscheidung und der Milchsäurekonzentration im Stuhl von Neugeborenen wie sie Abbildung 3 zeigt, stimmt mit den Ergebnissen von anderen Autoren überein (9)(12). Diese Verhältnisse wurden jedoch weder bei Frühgeborenen, Säuglingen und Kleinkindern noch bei Kindern mit Durchfällen gefunden. Auch besteht zwischen Milchsäurekonzentration und Gesamtzuckerausscheidung in den drei Kollektiven: Frühgeborene, Neugeborene und Säuglinge und Kleinkinder, und Kinder mit Diarrhöen keine statistische Korrelation.

Die Angaben über die drei Parameter Totalzucker, Milch-

säure und pH im Stuhl von Normalpersonen und Kindern mit chronischen Durchfällen sind in der Literatur sehr unterschiedlich. Während einige Autoren wie Auricchio und Mitarbeiter (9)(12) und Weijers und Mitarbeiter(109) keine Milchsäure im Stuhl von normalen Kindern finden konnten, so scheint es doch, wie auch hier gezeigt werden konnte, daß die Milchsäure ein normaler Bestandteil des Stuhls ist. Die hier erzielten Ergebnisse entsprechen denen von Clarke und Podmore(25), sowie Hooft und Mitarbeitern (55). Tomaszewski und Mitarbeiter (103) fanden einen noch höheren Wert von 300 mg/100 g Stuhl bei Früh- und Neugeborenen.

Vergleicht man die Milchsäurekonzentration von Normalpersonen und die von Kindern mit Diarrhoen, so besteht ebenso wie bei McMichael und Mitarbeiter(81) und Clarke et al.(25) kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (Abb. 4 und 5). Milchsäure entsteht im Darm aus verschiedensten Zuckern wie Arabinose, Xylose, Rhamnose, Glucose, Saccharose, Maltose und Lactose (79) und sie entsteht bis zu 80% durch den Abbau von Hexosen durch Bact. bifidum bei Brustkindern(97). Die gleichen Verhältnisse liegen für E.coli vor (59).

Ein pH-Wert unter 6.0 oder einfach ein "niedriges pH"(103) wird von vielen Autoren als ein Hinweis auf eine bestehende Zuckermalabsorption, sei es eine primäre oder sekundäre Disaccharidasendefizienz oder eine Glucose-Galactose-Malabsorption, genommen (1)(69)(70)(76)(109). Bei den hier untersuchten Kindern wurde kein signifikanter Unterschied zwischen Normalpersonen und Kindern mit Durchfällen gefunden ($p \leq 0.05$) (Abb.4 und 5).

Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen von Davidson und Mullinger (34) sowie McMichael und Mitarb.(81) bestätigt.

Erhebliche Diskrepanz herrscht in der Literatur über die Angaben der Gesamtzuckerausscheidung im Stuhl von Kindern mit und ohne Durchfälle. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die angegebenen Werte mit 6 verschiedenen Methoden gemessen wurden: Reduktionsproben, wie die Kupferreduktionsprobe(43) und die Clinitestmethode nach Kerry (60), die eine modifizierte Kupferreduktionsmethode ist;die Anthronmethode (104), die Hochvolt-elektrophorese nach Gryboski(48), die Papier- und Dünnschichtchromatographie(41)(62)(81) und enzymatische Methoden (34)(73).

Die unterschiedlichen Methoden und die ihnen innewohnenden Fehlern müssen zu recht unterschiedlichen Ergebnissen führen: die Kupferreduktionsprobe einschließlich Clinitestmethode erfaßt auch andere reduzierende Stoffe als Zucker im Stuhl. Die Anthronmethode erfaßt alle Kohlenhydrate, sowohl Polysaccharide als auch Oligo-,Di- und Monosaccharide. Die vergleichbar konstantesten Ergebnisse liefern die die vier zuletzt genannten Methoden. wobei in der vorliegenden Arbeit neben der modifizierten Anthronmethode - es wurden nur keimfrei filtrierte Stuhlproben gemessen- die dünnschichtchromatographische Identifikation der im Stuhl ausgeschiedenen Zucker angewandt wurde.

Einige Autoren fanden bei Normalpersonen keine Zuckerausscheidung im Stuhl(9)(12)(41), andere fanden verschiedene Konzentrationen von Zuckern im Stuhl. So fand Gryboski (48), daß 1-3 Tage alte Neugeborene 40-500 mg% Zucker pro Stuhlfrischgewicht, 1-2 Monate alte Säuglinge 20-800 mg% Zucker ausscheiden. Hooft und

und Mitarb. (55) sehen eine Ausscheidung von mehr als 50 m% als pathologisch an. Andere Autoren erklären eine Ausscheidung von mehr als 250 mg% als pathologisch (60) (69) (98).

Die in den eigenen Untersuchungen gefundenen Werte von 2.5 g/100 g Stuhl als Mittelwert liegen höher und korrelieren gut mit den von Ford und Haworth (43) sowie Davidson und Mullinger (34) gefundenen Zuckerausscheidungen.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Zucker im Stuhl von normalen Kindern und solchen mit Diarrhoen wird von verschiedenen Autoren ebenso unterschiedlich beurteilt.

Durand und Mitarb. (41) fanden in 20 Fällen keine Zucker im Stuhl von normalen Kindern mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie, während andere wie Baar und Bickel (17), Davidson und Mullinger (34) und McMichael und Mitarb. (81) in allen Fällen verschiedene Mono-, Di- und Oligosaccharide im Stuhl fanden. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den in Tabelle 1 gefundenen Ergebnissen. Ebenso wie bei diesen Autoren fand sich kein Unterschied zwischen Normalpersonen und Kindern mit Durchfällen. Beide Gruppen zeigten auch in ihrem Muster der verschiedenen Zucker im Stuhl, sowohl qualitativ als auch quantitativ, keine Unterschiede, zumindest nach der visuellen Abschätzung im Vergleich mit den bekannten Konzentrationen der mitaufgetragenen Standardlösungen.

Hinweise auf die Herkunft der einzelnen im Stuhl ausgeschiedenen Zucker ergeben sich aus der Gegenüberstellung der Zuckerausscheidung mit der verabreichten Nahrung und ihrem jeweiligen Zuckergehalt wie es Abb. 6 und 7 zeigen. Wie daraus hervorgeht, sind die im Stuhl ausgeschiedenen Zucker weitgehend mit

denen in der Nahrung enthaltenen bzw. ihren Spaltprodukten identisch. Bemerkenswert bei der dünn-schichtchromatographischen Analyse der einzelnen Milchen war die Tatsache, daß bei den volladaptierten Milchen: Multival FF und F 16 sowie Multival 2 das Disaccharid Palatinose als Inhaltsstoff gefunden wurde, ein Zucker, der in den entsprechenden Analysen der Herstellerfirma nicht aufgeführt war. Bei der allgemein geübten Praxis, Kindern mit Fruktose-Intoleranz volladaptierte Milchen zu verfüttern, würde diesen in einem gewissen Maße Fructose verabreicht werden, die aus der Hydrolyse von Palatinose entsteht.

Zu der Ausscheidung von Zuckern, die nicht in der Nahrung enthalten sind, kann folgendes gesagt werden: die Ausscheidung von Fructose bei Kindern, die Muttermilch, Humana 1 sowie Tee mit Glucose erhielten, läßt sich dadurch erklären, daß Glucose und Fructose über eine gemeinsame Enolform ineinander umwandelbar sind (97). Die Herkunft der Palatinose bei diesen Kindern bleibt unbekannt. Weidenhagen und Mitarbeiter (108) konnten aus dem Zuckerfabrikationsprozeß Bakterienstämme isolieren, die aus Saccharose mittels einer Isomerase Palatinose herstellen konnten. Möglicherweise existieren im menschlichen Darm analog wirk-same Keime. Unbekannt bleibt auch die Herkunft der Zucker Xylose, Arabinose und Galacturonsäure. Ein relativ großer Anteil der ausgeschiedenen Zucker konnte nicht identifiziert werden. In keinem Fall wurde Saccharose wiedergefunden, eine Beobachtung, die von anderen Autoren bestätigt. Abraham und Mitarb. (1) und Lindqvist und Meeuwisse (74) fanden bei Kindern mit Glucose-Galactose-Malabsorption nach Saccharosebelastungen keine Saccharose im Stuhl.

Die häufige Ausscheidung von Fucose ist dadurch zu erklären, daß sie einerseits in Oligosacchariden (17) und andererseits in stickstoffhaltigen Kohlenhydraten der Muttermilch enthalten ist(49).

Die prozentual höhere Ausscheidung von Galactose bei Frühgeborenen gegenüber Neugeborenen (Tabelle 1), läßt sich aus den Beobachtungen von Auricchio und Mitarb.(13) erklären, die eine erniedrigte Aktivität der β -Glykosidasen bei Frühgeborenen gefunden haben, so daß Lactose nicht völlig gespalten werden kann. Sie wird dann durch die Darmkeime hydrolysiert und als Glucose und Galactose ausgeschieden. Ebenfalls eine erniedrigte Disaccharidasenaktivität und einen verminderten Disaccharidmetabolismus postulierten Lifshitz und Mitarb.(71) bei Frühgeborenen. Sie fanden nach oraler Gabe von Lactose vermindert reduzierende Zucker im Blut und eine metabolische Azidose.

Bezüglich der Zuckerausscheidung und der Milchsäurekonzentrationen im Stuhl wurde kein Unterschied zwischen Normalen und Kindern mit chronischen Durchfällen gefunden (Abb. 4 und 5). Im Gegensatz dazu stehen Mitteilungen, in denen eine erhöhte Zuckerausscheidung bei Durchfällen als geradezu typisch beurteilt wird.

Als Grund für die erhöhte Ausscheidung von Zuckern wird hier der Mechanismus der osmotischen Diarrhoe diskutiert, hervorgerufen durch a.) mangelnde Spaltung von Disacchariden bei primärer oder sekundärer Disaccharidasendefizienz oder b.) verminderte Absorption von Monosacchariden bei Glucose-Galactose-Malabsorption (82)(109). Die Passagezeit in diesen Fällen sei verkürzt und es würden so vermehrt Zucker ausgeschieden, bzw durch die bakterielle Hydrolyse metabolisiert.

Zu dieser Auffassung paßt die Beobachtung von Torres-Pinedo und Mitarb. (105), daß die Absorption von Glucose und der Nettofluß von Wasser und Natriumchlorid in das Darmlumen bei Durchfall verändert ist: die Absorption von Glucose ist vermindert und der Nettofluß von Wasser und Salz ins Darmlumen ist abhängig von der Menge der absorbierten Glucose.

Die im Stuhl gefundene Zuckermenge hängt aber noch im wesentlichen vom Grad der bakteriellen Hydrolyse und damit auch von der Keimzahl ab, wie am Beispiel der Gesamtzuckerausscheidung von normalen Frühgeborenen und Neugeborenen gezeigt wurde (Abb. 1). Die im Dünndarm von normalen Kindern vorhandene Menge von Bakterien liegt zwischen 10^2 und 10^5 Keimen pro ml Dünndarmflüssigkeit (47) (101).

Coello-Ramirez und Lifshitz (26) konnten nun zeigen, daß bei Kindern mit Kohlenhydratintoleranz und Diarrhoen es zu einer Proliferation der Dünndarmkeime kommt. Sie beobachteten in durch Aspiration gewonnenen Proben eine Zunahme der Keime im Dünndarm von 10^2 auf 10^8 Keime pro ml intestinaler Flüssigkeit mit ansteigender Stärke der Kohlenhydratintoleranz. Die Zunahme der Proliferation der Keime hing ab von der Menge der nicht absorbierten Kohlenhydrate, die zu organischen Fettsäuren (109) und zu CO_2 (76) abgebaut wurden.

Schon Holzel machte die Beobachtung, daß bei zwei Geschwistern mit angeborener Lactose-Intoleranz keine Lactose im Stuhl ausgeschieden wurde und erklärte dies durch eine schnelle Spaltung durch die Darmkeime (54). Ebenso fanden Kaijser und Öckerman (58) bei einem Fall von Glucose-Galactose-Malabsorption nach Zuckertoleranztests nur geringe Mengen von Zuckern im Stuhl. Carredu und Mitarb. (24) fanden bei Kindern, die an Enteritis litten,

nach Disaccharidbelastungen nur ganz selten reduzierende Stoffe im Stuhl.

Wie aus diesen Beobachtungen hervorgeht und aus den eigenen Untersuchungen bestätigt wird, kann aus den im Stuhl ausgeschiedenen Zuckern, der Milchsäurekonzentration und des pH nicht auf den Typ und den Grad einer Zuckermalabsorption geschlossen werden, da die mit der Nahrung aufgenommenen Zucker bei Kindern mit Durchfällen komplizierten sich wechselseitig beeinflussenden Abbauwegen unterliegen.

Die Diagnose einer primären oder sekundären Disaccharidasen-defizienz kann besser durch die Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten in Dünndarmbiopsien: i.e. Maltase, Isomaltase, saccharase und Lactase, gestellt werden. Ebenso ist die Diagnose eines Mangels an Dipeptidhydrolasen durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten derselben genauer zu stellen.

Bei 30 Kindern wurden die Aktivitäten der Disaccharidasen mittels Dünnschichtchromatographie und Hexokinase-Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Methode gemessen. Die Normalwerte von 12 Kindern, die mit der Hexokinase-Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Methode gemessen wurden (Tabelle 2), stehen in guter Übereinstimmung mit den Normalwerten von Dunphy und Mitarb. (40), Burke und Mitarb. (23) und Auricchio und Mitarb. (14), so daß die mit dieser Methode gemessenen Werte gut als Vergleichswerte für die dünnschichtchromatographische Bestimmung der Disaccharidasen herangezogen werden können. Tabelle 3 zeigt die Ergebnisse von 10 Kindern mit Zöliakie, deren Disaccharidasen mit beiden Methoden gemessen wurden. Es herrscht gute Übereinstimmung. In allen Fällen, wo ein erniedrigter Wert quantitativ gefunden wurde, zeigte sich eine erniedrigte (+) oder fehlende Aktivität (0)

der Disaccharidasen mit der Dünnschichtchromatographie.

Was die Empfindlichkeit dieser Methode angeht, so konnte gezeigt werden, daß für Isomaltase, Saccharase und Lactase die Empfindlichkeit der Dünnschichtchromatographie bei 8.6 bzw 8.5 $\mu\text{mol/g Protein/Min}$ betrug.

Newcomer und McGill(84) definieren eine Lacatasedefizienz, wenn die Aktivität der Lactase kleiner als 5 $\mu\text{mol/g Protein/Min}$ ist und sprechen von einer normalen Lactaseaktivität, wenn sie größer als 10 $\mu\text{mol/g Protein/Min}$ ist. Die Empfindlichkeitsgranze liegt unter 10 $\mu\text{mol/g Protein/Min}$, so daß eine verminderte bzw. fehlende Aktivität gut erfaßt wird. Die Empfindlichkeitsgrenze für Maltase lag bei umgerechnet 21.2 $\mu\text{mol/g Protein/Min}$. Ein primärer Maltasemangel ist bisher nicht beschrieben worden, womit auch nicht zu rechnen ist, da für die Spaltung der Maltose 5 Maltasen zur Verfügung stehen.

Anderson und Mitarbeiter (3) beschreiben 1963 zum ersten Mal eine semiquantitative Methode zur Bestimmung der Disaccharidasen mittels Papierchromatographie. Die Dauer von 60 Stunden und die relativ geringe Empfindlichkeit sind die Nachteile dieser Methode gegenüber der Dünnschichtchromatographie. Hier beträgt die Zeit nur ein Drittel davon, die man benötigt, um die Disaccharidasen mit der Hexokinase-Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Methode zu messen. Die Empfindlichkeit ist auch hoch genug um noch kleine Aktivitäten erfassen zu können.

Die Enzymaktivitäten der Dipeptidspaltenden Enzyme i.e. Dipeptidhydrolasen wurden in Schleimhautproben von 60 Kindern gemessen. Hierbei wurden 11 verschiedene Dipeptidhydrolasen bestimmt. 22 Kinder (Gruppe I), die wegen gastrointestinaler Symptome biopsiert wurden, zeigten stereomikroskopisch und histologisch

eine normale Mukosa. Sie wurden als Kontrollpersonen zu den drei anderen Gruppen herangezogen. Dabei enthielt die Gruppe II 10 Kinder mit unbehandelter Zöliakie und histologisch totaler Zottenatrophie, die Gruppe III 17 Kinder mit Zöliakie nach Behandlung mit glutenfreier Diät und histologisch partieller Zottenatrophie bzw. leichter Reduktion des Höhensaums der Villi der Dünndarmepithelien. Gruppe IV enthielt 12 Kinder mit den Symptomen eines Malabsorptionssyndromes, die Krankheitszusammensetzung dieser Gruppe war aber uneinheitlich.

Zum Vergleich für die dünnsschichtchromatographische Bestimmung der Dipeptidhydrolasen wurden von diesen 60 Kindern die Gly-Leu und Ala-Leu Dipeptidhydrolasen mit der quantitativen Methode nach Auricchio und Mitarb.(11) gemessen.

Die Normalwerte der Gly-Leu Dipeptidhydrolase stehen in guter Übereinstimmung mit denen von Berg und Mitarb.(20) ($212 \mu\text{mol}/\text{Min}/\text{mg N}$) und Dahlqvist und Mitarb.(33) ($190 \mu\text{mol}/\text{Min}/\text{mg N}$) unter der Berücksichtigung, daß die dort angegebenen Werte mit einer anderen Methode gemessen worden sind. Für die Ala-Leu Dipeptidhydrolase gibt es bisher keine verwertbaren Normalwerte in der Literatur.

Die Tatsache, daß die Gly-Leu Dipeptidhydrolase signifikant erniedrigt bei Kindern mit unbehandelter Zöliakie und nicht signifikant verändert bei solchen mit behandelter Zöliakie war, steht in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen anderer Autoren(16) (33) (72) (Tabelle 4). Die Ala-Leu Dipeptidhydrolase verhielt sich ebenso wie die Gly-Leu Dipeptidhydrolase in den Gruppen II und III gegenüber Normalpersonen.

In Abb. 14 wird die quantitative Aminosäure-Oxidase-Methode

mit der dünnschichtchromatographischen Bestimmung der Gly-Leu und Ala-Leu Dipeptidhydrolasen verglichen. Dabei zeigt die dünnschichtchromatographische Methode gute Übereinstimmung mit den Werten der gleichzeitig quantitativ gemessenen Methode. Die dünnschichtchromatographische Methode hat aber den Vorteil, daß sie für alle Substrate anwendbar ist, während die Aminosäure-Oxidase-Methode mit den folgenden Aminosäuren keine Reaktion zeigt: Glutaminsäure, Prolin, Alanin, Asparagin (37), Glycin(11), und Hydroxyprolin (107).

Abbildung 15 zeigt die Veränderungen der Dipeptidhydrolasen und Disaccharidasen in den verschiedenen Gruppen. Die durchweg erniedrigten Aktivitäten der Dipeptidhydrolasen in der Gruppe der Kinder mit unbehandelter Zöliakie, wurden auch von anderen Autoren gefunden(39) (92). Das Verhalten der Aktivitäten der Dipeptidhydrolasen bei Kindern mit unbehandelter und behandelter Zöliakie kann am ehesten auf die auch morphologisch eindrucksvolle Alterationen der Oberflächenstruktur der Dünndarmmukosa zurückgeführt werden(35) (37) (75).

Die Dipeptidhydrolasen sind hauptsächlich im Zytoplasma der Dünndarmepithelien lokalisiert(36) (51) (86), während nur 8-10% der gesamten Aktivität in der "brush border region" der Dünndarmepithelien vorhanden ist (61) (87). Eine Alteration der Epithelzelle, wie sie bei der Zöliakie vorkommt, kann also eine Erniedrigung der Aktivitäten der Dipeptidhydrolasen durch eine Verminderung der resorptiven Oberfläche und der Zahl der resorptiven Zellen überhaupt, bewirken. Diese Veränderungen müssen als sekundäres Phänomen bei der Zöliakie gewertet werden und nicht wie Frazer(45) postulierte, ursächlich für diese Erkrankung sein.

In der Gruppe der behandelten Kinder mit Zöliakie sind die Aktivitäten der Dipeptidhydrolasen kaum noch erniedrigt mit Ausnahme der Val-Glu und Val-Pro Dipeptidhydrolasen. Diese Beobachtung stimmt mit der anderer Autoren überein, daß die Aktivität der Spaltung von Prolin enthaltenden Dipeptiden bei Kindern mit behandelter Zöliakie erniedrigt ist (20) (33) (35) (52).

Zur Kontrolle der Ergebnisse der Aktivitäten der Dipeptidhydrolasen in den 4 Gruppen haben wir auch die Disaccharidasen bestimmt (Abb.15). So zeigten 70% der Kinder mit unbehandelter Zöliakie eine Lactasedefizienz. Bei den restlichen 30% war die Lactase vermindert.

Im Unterschied zu den Dipeptidhydrolasen sind die Disaccharidasen in der "brush border" Region der Dünndarmepithelien lokalisiert. So konnten Forstner und Mitarb. (44) durch Zellfraktionierungsstudien zeigen, daß die größte Aktivität der Disaccharidasen in der "gereinigten" brush border Fraktion vorhanden ist. Gitzelmann und Mitarb. (46) konnten die Saccharase mittels Reaktion des Enzyms mit Ferritin-Antikörperverbindungen auf der äußeren Membranschicht der Mikrovilli darstellen.

Bei der Charakterisierung der Lactase fand man 3 verschiedene Enzyme: eine neutrale β -Galactosidase (7), eine saure β -Galactosidase, die im Cytoplasma lokalisiert ist (2) und eine lösliche hetero- β -Galactosidase, die wahrscheinlich auch im Cytoplasma lokalisiert ist, und Heterogalactoside (Phenyl- β -Galactoside, o-nitrophenyl- β -Galactoside, p-nitrophenyl- β -Galactoside, 6-bromo-2-naphthyl- β -Galactoside, nicht jedoch Lactose) hydrolysiert. (5) (8). Angesichts dieser Lokalisation reagieren die Disaccharidasen, insbesondere die Lactase empfindlich auf eine

morphologische Veränderungen der Dünndarmepithelien. So war auch die Aktivität der Lactase in der Gruppe III mehr erniedrigt als die der anderen Disaccharidasen. Sie reagiert empfindlicher und bleibt auch im Verlauf der Behandlung länger erniedrigt als die der anderen Disaccharidasen (31) (77).

In der Gruppe IV sind die Aktivitäten der Dipeptidhydrolasen und der Lactase mit Ausnahme der Ala-Pro und Val-Pro Dipeptidhydrolasen in verschiedenem Ausmaß vermindert. Die Veränderungen in dieser Gruppe, die aus verschiedenen Krankheiten zusammengesetzt ist, lassen sich wiederum auf die morphologischen Alterationen der Architektur der Dünndarmmukosa zurückführen und als Zeichen einer defekten finalen Verdauung von Nahrungsbestandteilen betrachten.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Im Stuhl von 135 gesunden Frühgeborenen, Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern und im Stuhl von 28 Kindern mit Diarrhoe wurden bestimmt: Gesamtzuckergehalt, Milchsäurekonzentration, pH und dünnschichtchromatographisch die Zuckerspektren. Es konnte gezeigt werden, daß weder die Altersgruppen untereinander noch die gesunden Kinder gegenüber den Kindern mit Diarrhoen signifikante Unterschiede in einem der untersuchten Parameter boten.

Es wird gefolgert, daß die Diagnose einer Zuckermalabsorption aus diesen Parametern nicht zu stellen ist, sondern besser durch die Bestimmung der Enzymaktivitäten der Disaccharidasen der Dünndarmmukosa gefolgert werden kann.

Dazu wird eine dünnschichtchromatographische Methode aufgezeigt zur Bestimmung der intestinalen Disaccharidasen, wobei die Disaccharide als Substrate nach Inkubation mit intestinalem Biopsie-Material benutzt wurden.

Zum Vergleich wurden die Aktivitäten der Disaccharidasen quantitativ mit der Hexokinase-Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Methode gemessen. Es wurde eine gute Übereinstimmung beider Methoden bei normalen Kindern und 15 Kindern mit Cöliakie gefunden. In der Gruppe der unbehandelten Cöliakiekinder fand sich in allen Fällen eine erniedrigte oder fehlende Aktivität der Lactase und eine Verminderung der Aktivitäten der Isomaltase und Saccharase. Somit ist die Cöliakie die häufigste Ursache einer sekundären Disaccharidasendefizienz im Kindesalter.

Diese Ergebnisse wurden sowohl mit der quantitativen Methode als auch mit der semiquantitativen dünnschichtchromatographischen Methode reproduziert.

Die Sensibilität der Dünnschichtchromatographischen Methode ist groß genug, um auch kleine Aktivitäten zu bestimmen. Im Vergleich mit anderen Methoden ist ihr Vorteil die Einfachheit der Methode und ihr relativ geringer Zeitaufwand.

Zur Bestimmung der Dipeptidasen wurde ebenfalls eine neue dünnschichtchromatographische Methode aufgezeigt. Dabei wurden die Dipeptide als Substrate zusammen mit intestinalem Biopsie-Material von Cöliakie-Kindern verwendet. Im Vergleich dazu wurden 2 Dipeptidasen mit der quantitativen Aminosäure-Oxidase-Methode gemessen, die eine gute Übereinstimmung mit der dünnschichtchromatographischen Methode zeigte.

Es wurde das Verhalten von 11 Dipeptidasen unter normalen und pathologischen Bedingungen geprüft. Dies konnte aus den Schleimhautproben von 60 Kindern gezeigt werden, die in 4 Gruppen eingeteilt wurden: Gruppe I mit normalen Kontrollen, Gruppe 2 mit Kindern, die an einer unbehandelten Cöliakie litten, Gruppe 3 Kinder mit behandelter Cöliakie und Gruppe 4 Kinder mit Malabsorptionssyndromen.

Hierbei konnte gezeigt werden, daß die menschliche Mukosa die Dipeptide Tyr-Tyr und Ala-Leu spalten kann, über die bisher keine Mitteilungen in der Literatur bekannt sind. Das Verhalten der Tyr-Tyr und Ala-Leu Dipeptidasen war ebenso wie das der anderen Dipeptidasen: bei unbehandelter Cöliakie erniedrigt, bei behandelter Cöliakie beinahe normal.

Der Vorteil der dünnschichtchromatographischen Methode

zur Bestimmung der Dipeptidasen ist, daß sie universell angewendet werden kann und daß aus geringen Mukosamengen eine große Anzahl von Dipeptidasen gemessen werden können.

Teile der Arbeit wurden mit Genehmigung von Herrn Prof.K.Betke (Direktor der Universitätskinderklinik München) in folgenden Zeitschriften veröffentlicht:

- 1) Lentze, M., Schaub, J. and K. Harms:

A simple and rapid thin-layer chromatographic method for the assay of intestinal disaccharidases.

Clin. Chim. Acta, 33, 301-307 (1971)

- 2) Lentze, M., Schaub, J. and K. Harms:

A simple thin-layer chromatographic technique for the assay of intestinal dipeptide hydrolases from human mucosal biopsy material.

Clin. Chim. Acta, 49, 19-26 (1973)

- 3) Schaub, Jürgen and Michael Lentze:

Sugars, Lactic acid and pH in Feces of Children.

A useful approach for Gastrointestinal Disorders?

Z. Kinderheilk., 115, 141-153 (1973)

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Abraham, J.M., Levin, B., Oberholzer, V.G. and Russel, A.:
Glucose-galactose malabsorption.
Arch. Dis. Childh., 42, 592 (1967)
- 2) Alpers, D.H.:
Separation and isolation of rat and human
intestinal β -galactosidases.
J. Biol. Chem., 244, 1238 (1969)
- 3) Anderson, C.M., Messer, M., Townley, R.R.W. and Freeman, M.:
Intestinal sucrase and isomaltase deficiency
in two siblings.
Pediatrics, 31, 1003 (1963)
- 4) Anderson, D.H.:
Celiac syndrome. Determination of fat in faeces,
reliability of 2 chemical methods and of
microscopic estimate. Excretion of faeces
and of fecal fat in normal children.
Amer.J.Dis. Childh., 69, 141 (1945)
- 5) Antonowicz, I., and Shwachman, H.:
Beta-galactosidase and beta-glucuronidase
activities in intestinal mucosa of infants
and children.
Pediatrics, 47, 737 (1971)
- 6) Arthur, A.B., Clayton, A., Cottom, D.G., Seakins, J.W.T.
and Platt, J.W.:
Importance of disaccharide intolerance in
the treatment of coeliac disease.
Lancet, I, 173 (1966)
- 7) Asp, N.G. and Dahlqvist, A.:
Rat small-intestinal β -galactosidases.
Biochem. J., 110, 143 (1968)
- 8) Asp, N.G., Dahlqvist, A. and Koldovsky, O.:
Small intestinal β -galactosidase activity.
Gastroenterology, 58, 591 (1970)

- 9) Auricchio, S., Dahlqvist, A., Mürset, G. and Prader, A.:
Isomaltose intolerance causing decreased
ability to utilize dietary starch.
J. Pediat., 62, 165 (1963)
- 10) Auricchio, S., Pierro, M., Andria, G. and de Ritis, G.:
Enzymic activities of brush border membrane
of rat intestine hydrolyzing β -naphthyl-
amides of amino acids, leucinamides and
dipeptides.
Biochim. Biophys. Acta, 274, 420 (1972)
- 11) Auricchio, S., Pierro, M. and Orsatti, M.:
Assay of peptidase activities of intestinal
brush border membrane with L-amino acid oxidase.
Eur. J. Clin. Invest., 1, 125 (1970)
- 12) Auricchio, S., Prader, A., Mürset, G. und Witt, G.:
Saccharoseintoleranz: Durchfall infolge
hereditären Mangels an intestinaler
Saccharaseaktivität.
Helv. Paediat. Acta, 16, 483 (1961)
- 13) Auricchio, S., Rubino, A. and Mürset, G.:
Intestinal glycosidase activities in the
human embryo, fetus and newborn.
Pediatrics, 35, 944 (1965)
- 14) Auricchio, S., Rubino, A., Prader, A., Rey, J., Jos, J.,
Frézal, J. and Davidson M.:
Intestinal glycosidase activities in congenital
malabsorption of disaccharides.
J. Pediat., 66, 555 (1965)
- 15) Auricchio, S., Rubino, A., Tosi, R., Semenza, G., Landolt, M.,
Kistler, H. and Prader, A.:
Disaccharidase activities in human intestinal
mucosa.
Enzymol. Biol. et Clin., 3, 193 (1963)

- 16) Auricchio, S, Semenza, G., and Rubino, A.:
Multiplicity of human intestinal disaccharidases. II. Characterization of individual maltases.
Biochim. Biophys. Acta, 96, 498 (1965)
- 17) Baar, S. and Bickel, H.:
Oligosaccharides in infants faeces.
J. Clin. Path., 17, 273 (1964)
- 18) Bayless, T.M. and Rosensweig, N.S.:
A racial difference in incidence of lactase deficiency.
J. Amer. Med. Assoc., 197, 968 (1966)
- 19) Beisenherz, G., Boltze, H.J., Bücher, Th., Czok, R., Garbach, K.H., Meyer-Arendt, E. und Pfleiderer, G.:
Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturforsch., 8 b, 555 (1953)
- 20) Berg, N.O., Dahlqvist, A., Lindberg, T. and Norden, A.:
Intestinal dipeptidases and disaccharidases in celiac disease in adults.
Gastroenterology, 59, 575 (1970)
- 21) Bremer, H.J., Marx, D., Nützenadel, W. und Bickel, H.:
Die Dünnschichtchromatographie der Aminosäuren im Urin.
Klin. Wschr., 48, 682 (1970)
- 22) Burgess, E.A., Levin, B., Mahalanabis, D. and Tonge, R.E.:
Hereditary sucrose intolerance: levels of sucrose activity in jejunal mucosa.
Arch. Dis. Childh., 39, 431 (1964)

- 23) Burke, V., Kerry, K.R., and Anderson, C.M.:
The relationship of dietary lactose to
refractory diarrhoea in infancy.
Aust. Paediat. J., 1, 147 (1965)
- 24) Carredu, P., Giovannini, M. and Cevini, G.:
Vorübergehende Disaccharidintoleranz bei den
Ernährungsstörungen des Säuglingsalters.
Helv. Paediat. Acta, 18, 97 (1963)
- 25) Clarke, A.D. and Podmore, D.A.:
The enzymatic determination of lactic acid
in faeces in glycosidase deficiency.
Clin. Chim. Acta, 13, 725 (1966)
- 26) Coello-Ramirez, P., and Lifshitz, F.:
Enteric microflora and carbohydrate intolerance
in infants with diarrhea.
Pediatrics, 49, 233 (1972)
- 27) Crane, R.K.:
Enzymes and malabsorption: a concept of
brush border membrane disease.
Gastroenterology, 50, 254 (1966)
- 28) Crosby, W.H. and Kugler, H.W.:
Intraluminal biopsy of the small intestine:
The intestinal biopsy capsule.
Amer. J. Digest. Dis., 2, 236 (1957)
- 29) Dahlqvist, A.:
"Substrate inhibition" of intestinal glyco-
sidases.
Acta Chem. Scand., 14, 1797 (1960)
- 30) Dahlqvist, A.:
Hog intestinal isomaltase activity.
Acta Chem. Scand., 14, 72 (1960)
- 31) Dahlqvist, A.:
Assay of intestinal disaccharidases.
Enzym. Biol.Clin., 11, 52 (1970)

- 32) Dahlqvist, A., Auricchio, S., Semenza, G. and Prader, A.:
Human intestinal disaccharidases and hereditary disaccharid intolerance. The hydrolysis of sucrose, isomaltose, palatinose and 1.6- α -oligosaccharide (isomalto-oligosaccharide) preparation.
J. Clin. Invest., 42, 556 (1963)
- 33) Dahlqvist, A., Lindberg, T., Meeuwisse, G. and Akerman, M.:
Intestinal dipeptidases and disaccharidases in children with malabsorption.
Acta Paediat. Scand., 59, 621 (1970)
- 34) Davidson, A.G.F. and Mullinger, M.:
Reducing substances in neonatal stools detected by Clinitest.
Pediatrics, 46, 632 (1970)
- 35) Dillon, A., Duffy, J., Dolly, J.O. and Fotrell, P.F.:
Molecular heterogeneity of human intestinal peptidases from control subjects and children with treated and untreated coeliac disease.
Biochem. J., 119, 7 p (1970)
- 36) Dolly, J.O., Dillon, A., Duffy, M.J. and Fotrell, P.F.:
Further studies on multiple forms of peptidases in mammalian tissue including intestinal mucosa from children with treated and untreated coeliac disease.
Clin. Chim. Acta, 31, 55 (1971)
- 37) Dolly, J.O. and Fotrell, P.F.:
Multiple forms of dipeptidases in normal intestinal mucosa and in mucosa from children with coeliac disease.
Clin. Chim. Acta, 26, 555 (1969)
- 38) Donlon, J. and Fotrell, P.F.:
Quantitative determination of intestinal peptide hydrolase activity using L-amino-acid oxidase.
Clin. Chim. Acta, 33, 345 (1971)

- 39) Douglas, A.P. and Peters, T.J.:
Peptide hydrolase activity of human intestinal mucosa in adult coeliac disease.
Gut, 11, 15 (1970)
- 40) Dunphy, J.V., Littman, A., Hammond J.B., Forstner, A.,
Dahlqvist, A. and Crane, R.K.:
Intestinal lactase deficit in adults.
Gastroenterology, 49, 12 (1965)
- 41) Durand, P., Martino, A.M., and Lamedica, G.M.:
Diagnosis of carbohydrate intolerance diarrheas
by stool chromatography.
Lancet, II, 374 (1961)
- 42) Feldheim, G., Schmidt, E.F. und Haenel H.:
Über die Besiedlung des Mekonioms.
Zbl. Bakt. I., Orig., 177, 62 (1960)
- 43) Ford, J.D. and Haworth, J.C.:
The fecal excretion of sugars in children.
J. Pediat., 63, 988 (1963)
- 44) Forstner, G.G., Sabesin, S.M. and Isselbacher, K.J.:
Rat intestinal microvillous membranes.
Biochem. J., 106, 381 (1968)
- 45) Frazer, A.C.:
Discussion on some problems of steatorrhea
and reduced stature.
Proc. Roy. Soc. Med., 49, 1009 (1956)
- 46) Gitzelmann, R., Bächli, Th., Binz, H., Lindemann, J.,
and Semenza, G.:
Localization of rabbit intestinal sucrase with
ferritin-antibody conjugates.
Biochim. Biophys. Acta, 196, 20 (1970)
- 47) Gorbach, S.L., Nahas, L., Lerner, P.I. and Weinstein, L.:
Studies on intestinal microflora: I. Effect
of diet, age and periodic sampling on numbers
of fecal microorganism in man.
Gastroenterology, 53, 845 (1967)

- 48) Gryboski, J.D., Ellis, J and Ma, O.H.:
A study of fecal sugars by high voltage
electrophoresis.
Gastroenterology, 47, 26 (1964)
- 49) György, P.:
Biochemical aspects (the uniqueness of human
milk).
Amer. J. Clin. Nutr., 24, 970 (1971)
- 50) Harms, K.:
Das Malabsorptionssyndrom im Kindesalter.
Med. Klin., 68, 163 (1973)
- 51) Heizer, W.D., Kerley, R.L. and Isselbacher, K.J.:
Intestinal peptide hydrolases differences
between brush border and cytoplasmic enzymes.
Biochim. Biophys. Acta. 264, 450 (1972)
- 52) Heizer, W.D. and Laster, L.:
Peptide hydrolase activities of the mucosa
of human small intestine.
J. Clin. Invest., 48, 210 (1969)
- 53) Heizer, W.D. and Laster L.:
Hydrolases in the mucosa of rat small in-
testine for phenylalanine containing dipeptides.
Biochim. Biophys. Acta, 185, 409 (1969)
- 54) Holzel, A., Schwarz, V. and Sutcliffe, K.W.:
Defective lactose absorption causing malnutri-
tion in infancy.
Lancet, I, 1126 (1959)
- 55) Hooft, C., Devos, E., Kriekemans, J. and Van Damme, J.:
Malabsorption and diabetes mellitus in children.
Helv. Paediat. Acta, 23, 478 (1968)
- 56) Ichihashi, Y.:
Colonization of bacteria in man.
J. Jap. Med. Assoc., 67, 702 (1972)

- 57) Josefson, L. and Lindberg, T.:
Intestinal dipeptidases. I. Spectrophotometric determination and characterization of dipeptidase activity in pig intestinal mucosa.
Biochim. Biophys. Acta, 105, 149 (1965)
- 58) Kaijser, K. and Ökerman, P.A.:
Diagnostic problems in glucose-galactose malabsorption.
Acta Paediat. Scand., 59, 214 (1970)
- 59) Kauffmann, F.:
The bacteriology of enterobacteriaceae.
Munksgaard-Copenhagen, S. 21 ff. (1966)
- 60) Kerry, K.R. and Anderson, C.M.:
A ward test for sugar in faeces.
Lancet, I, 981 (1964)
- 61) Kim, Y.S., Birtwhistle, W. and Kim, Y.W.:
Peptide hydrolases in the brush border and soluble fraction of small intestinal mucosa of rat and man.
J. Clin. Invest., 51, 1419 (1972)
- 62) Krafczyk, F., Helger, R. and Bremer, H.J.:
Thin layer chromatographic screening tests for carbohydrate anomalies in plasma, urine and faeces.
Clin. Chim. Acta, 42, 303 (1972)
- 63) Krafczyk, F., Helger, R., Lang, H. and Bremer, H.J.:
Thin layer chromatographic screening tests for amino acid anomalies in urine without desalting using internal standards.
Clin. Chim. Acta, 35, 345 (1971)
- 64) Laplane, R., Polonovski, C., Etienne, M., Debray, P., Lods, J.C. and Pissaro, B.:
L'intolerance aux sucres à transfert intestinal actif. Ses rapports avec l'intolerance au lactose et le syndrome coeliaque.
Arch. Franc. Pediat., 19, 895 (1962)

- 65) Lato, M., Brunelli, B., Ciuffini, G. and Mezetti, T.:
Bidimensional thin layer chromatography of
carbohydrates on silica gel impregnated with
boric acid.
J. Chromatog., 34, 35 (1968)
- 66) Launalia, K., Perheentupa, J., Visakorpi, J. and Hallman, N.:
Disaccharidases of intestinal mucosa in a
patient with sucrose intolerance.
Pediatrics, 34, 615 (1964)
- 67) Lenard, J., Johnson, S.L., Hyman, R.W. and Hess, G.P.:
A continuous automatic method for the study
of rate of hydrolysis of peptides and amides.
Anal. Biochem., 11, 30 (1965)
- 68) Lewis, W.H.P. and Harris, H.:
Human red cell peptidases.
Nature, 215, 351 (1967)
- 69) Lifshitz, F., Coello-Ramirez, P., Contreras-Gutierrez, M.L.:
The response of infants to carbohydrate
oral loads after recovery from diarrhea.
J. Pediat., 79, 612 (1971)
- 70) Lifshitz, F., Coello-Ramirez, P., Gutierrez-Topete, G.
and Cornado-Cornet, M.C.:
Carbohydrate intolerance in infants with
diarrhea.
J. Pediat., 79, 760 (1971)
- 71) Lifshitz, F., Diaz-Benussen, S., Martinez-Garza, V.,
Abda-Barsols, F. and Diaz del Castillo, E.:
Influence of disaccharides on the development
of systemic acidosis in the premature infant.
Pediat. Res., 5, 213 (1971)
- 72) Lindberg, T.:
Dipeptidase activity in small intestinal
mucosa in patients with gluten induced
enteropathy.
Acta Paediat. Scand., 177, 23 (1967)

- 73) Lindqvist, B.:
Die intestinale Monosaccharid-Malabsorption.
Mschr. Kinderheilk., 117, 18 (1969)
- 74) Lindqvist, B. and Meeuwisse, G.W.:
Chronic diarrhoea caused by monosaccharide
malabsorption.
Acta Paediat. Scand., 51, 674 (1962)
- 75) Lindberg, T., Norden, A. and Josefson, L.:
Intestinal dipeptidases. Dipeptidase acti-
vity in small intestinal biopsy specimens
from a clinical material.
Scand. J. Gastroent., 3, 177 (1968)
- 76) Linneweh, F.:
Isotopen-Anwendung bei der Erforschung
erblicher Stoffwechselkrankheiten.
Mschr. Kinderheilk., 118, 191 (1970)
- 77) Lubos. M.C., Gerrard, J.W. and Buchan, D.J.:
Disaccharidase activity in milk sensitive
and celiac patients.
J. Pediat., 70, 325 (1967)
- 78) Matheson, A.T. and Tatrie, B.L.:
A modified Yemm and Cocking ninhydrin
reagent for peptidase assay.
Can J. Biochem., 45, 95 (1964)
- 79) Mayer, J.B., Tewes, G., Pluta, U. und Dittmann, J.:
Zum Stoffwechsel des Bact. bifidum.
VIII. Mitteilung. Typenbestimmung
unserer Stämme.
Z. Kinderheilk., 94, 141 (1965)
- 80) McCarthy, C.F., Gough, K.R., Rodriguez, M. and Read, A .E.:
Peroral intestinal biopsy with a small
Crosby capsule.
Brit. Med. J., I, 1620 (1964)

- 81) McMichael, H.B., Webb, J. and Dawson, A.M.:
Lactase deficiency in adults, a cause
of functional diarrhoea.
Lancet, I, 717 (1965)
- 82) Meeuwisse, G.W. and Melin, K.:
Glucose-galactose malabsorption.
Acta Paediat. Scand., 188, 3 (1969)
- 83) Messer, M., Anderson, C.M. and Townley, R.R.W.:
Peptidase activity of biopsies of
the duodenal mucosa of children with
and without coeliac disease.
Clin. Chim. Acta, 6, 768 (1961)
- 84) Newcomer, A.D. and McGill, D.B.:
Distribution of disaccharidase activity
in the small bowel of normal and
lactase deficient subjects.
Gastroenterology, 51, 481 (1966)
- 85) Peternel, W.W.:
Disaccharidase deficiency.
Med. Clin. North Amer., 52, 1355 (1968)
- 86) Peters, T.J.:
The subcellular localization of di- and
tripeptide hydrolase activity in guinea
pig small intestine.
Biochem. J., 120, 195 (1970)
- 87) Rhodes, J.B., Eichholz, A.E., and Crane, R.K.:
Studies on the organization of the brush
border in intestinal epithelial cells.
IV. Aminopeptidase activity in microvillous
membranes of hamster intestinal brush borders.
Biochim. Biophys. Acta, 135, 959 (1967)
- 88) Roe, J.H.:
The determination of sugar in blood and
spinal fluid with anthrone reagent.
J. Biol. Chem., 212, 335 (1955)

- 89) Rosebury, T.:
Microorganism indigenous to man.
435 pp., New York, McGraw Hill 1962
- 90) Rotthauwe, H.W., Emons, D. und Flatz, G.:
Die Häufigkeit der Lactose-Intoleranz bei
gesunden Erwachsenen in Deutschland.
Dtsch.Med. Wschr., 97, 376 (1972)
- 91) Rubin, C.E. and Dobbins, W.O.:
Peroral biopsy of the small intestine.
A review of its diagnostic usefulness.
Gastroenterology, 49, 676 (1965)
- 92) Sadikali, F.:
Dipeptidase deficiency and malabsorption
of glycylglycine in disease states.
Gut., 12, 276 (1972)
- 93) Semenza, G., Auricchio, S. and Rubino, A.:
Multiplicity of human intestinal disaccha-
ridases. I. Chromatographic separation
of maltases and of two lactases.
Biochim. Biophys. Acta, 96, 487 (1965)
- 94) Shmerling, D.H.:
Peroral intestinal mucosal biopsies
in infants and children.
Helv. Paediat. Acta, 22, 1 (1970)
- 95) Shmerling, D.H., Auricchio, S., Rubino, A., Hadorn, B.
and Prader, A.:
Der sekundäre Mangel an intestinaler
Disaccharidasenaktivität bei der Cöliakie.
Quantitative Bestimmung der Enzymaktivität
und klinische Bedeutung.
Helv. Paediat. Acta, 19, 507 (1964)
- 96) Sinha, K.P., Lewis, W.H.P., Corney, G. and Harris, H.:
Studies on the quantitative variation of human
red cell peptidase A activity.
Ann. Hum. Genet., Lond., 34, 153 (1970)

- 97) Sinterhauf, K, Mayer, J.B. und Dittmann, J.:
Zum Stoffwechsel des Bact. bifidum.
IX. Mitteilung. Abbau von Kohlenhydraten
durch Bact. bifidum.
Z. Kinderheilk., 97, 146 (1966)
- 98) Soeparto, P., Stobo, E.A. and Walker-Smith, J.A.:
Role of chemical examination of the stool
in the diagnosis of sugar malabsorption in
children.
Arch. Dis. Childh., 47, 56 (1972)
- 99) Sols, A. and De la Fuente, G.:
Hexokinase and other enzymes of sugar
metabolism in the intestine.
In: Methods in Medical Research, Vol. 9
p. 302 (1962)
- 100) Stahl, E.:
Dünnschichtchromatographie
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg,
8. Auflage (1962)
- 101) Tabaqchali, S. and Booth, C.C.:
Relationship of the intestinal bacterial
flora to absorption.
Brit. Med. Bull., 23, 285 (1967)
- 102) Teorell, T. und Stenhagen, E.:
Ein Universalpuffer für den pH-Bereich
2.0 bis 12.0.
Biochem.Z., 299, 416 (1938)
- 103) Tomaszewski, L., Hofman, H., Brzozowska, I. and
Zalewski, T.:
Lactic acid excretion with stools by
premature babies, newborns, infants
and healthy children.
Pediatr. Pol., 46, 13 (1971)

- 104) Torres-Pinedo, R., Lavastida, M., Rivera, G., Rodriguez, H.
and Ortiz, A.:
Studies on infant diarrhea:
I. Comparison of the effect of milk feeding
and intravenous therapy upon the composition
and volum of the stool and urine.
J. Clin. Invest., 45, 469 (1966)
- 105) Torres-Pinedo, R., Rivera, G., and Fernandez, S.:
Studies on infant diarrhea:
II. Absorption of glucose and net fluxes
of water and sodium chlorid in a segment
of the jejunum.
J. Clin. Invest., 45, 1916 (1966)
- 106) Townley, R.R.W., Khaw, K.T. and Shwachman, H.:
Quantitative assay of disaccharidase
activities of small intestinal mucosal
biopsy specimens in infancy and childhood.
Pediatrics, 36 911 (1965)
- 107) Van Dyke, K. and Szustkiewicz, C.:
An automated detection-system for most
L- α -amino acids.
Clin. Chem., 15, 154 (1969)
- 108) Weidenhagen, R. und Lorenz, S.:
Palatinose (6- α -Glucopyranosido-fructofuranose)
ein neues bakterielles Umwandlungsprodukt
der Saccharose.
Zeitschr. f.d. Zuckerindustrie, 7, 533 (1957)
- 109) Weijers, H.A., Van de Kamer, J.H, Dicke, W.K. and
Ijsseling, J.:
Diarrhoea caused by deficiency of sugar
splitting enzymes.
Acta Paediat. Scand., 50, 55 (1961)

- 110) Welsh, J.D.:
Isolated lactase deficiency in human:
report on 100 patients.
Medicine, 49, 257 (1970)
- 111) Zimprich, H. und Lothaller, H.:
Verlaufskontrolle beim Zöliakiesyndrom
unter besonderer Berücksichtigung
dünnschichtchromatographischer Methoden.
Wien. Klin. Wochenschr., 82, 253 (1970)
- 112) Zoppi, G., Hadorn, B., Gitzelmann, R., Kistler, H.
and Prader, A.:
Intestinal β -galactosidase activities
in malabsorption syndrome.
Gastroenterology, 50, 557 (1966)

Lebenslauf

Am 27. November 1945 wurde ich als Sohn des Dr.iur. Helmut Lentze und seiner Ehefrau Elfriede in Oberammergau geboren. 1948 siedelten wir nach Frankfurt am Main um, wo ich 1952 eingeschult wurde. Von 1956 - 1965 besuchte ich das altsprachliche Lessing-Gymnasium, wo ich am 2.Februar 1965 meine Reifeprüfung ablegte. Nach einem Jahr Wehrdienst begann ich mein Medizinstudium an der Universität Frankfurt im Sommersemester 1966. Im September 1968 legte ich dort meine ärztliche Vorprüfung ab. Im Sommersemester 1969 wechselte ich an die Universität München. Dort bestand ich am 21.Dezember 1971 meine ärztliche Prüfung. Danach Beginn der Medizinalassistentenausbildung am Städtischen Krankenhaus Penzberg sowie an der Medizinischen Poliklinik der Universität München. Seit 1.7.73 bin ich als Assistent an der Universitätskinderklinik München tätig.

Herrn Priv.Do. Dr. Jürgen Schaub danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Arbeitsplatzes, für die stets hilfreiche Unterstützung und den Rat zur Durchführung dieser Arbeit.

